

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

Marina Pasqualli

**POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO, ANTIGENOTÓXICO
E ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS AQUOSOS E DO
ÓLEO DE *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae)**

Santa Maria, RS
2016

Marina Pasqualli

**POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO, ANTIGENOTÓXICO E ANÁLISE
FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS AQUOSOS E DO ÓLEO DE *Baccharis
dracunculifolia* DC. (Asteraceae)**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a. 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).

Pasqualli, Marina

POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO, ANTIGENOTÓXICO E ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS AQUOSOS E DO ÓLEO DE *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae) / Marina Pasqualli.- 2016.

47 p.; 30 cm

Orientadora: Solange Bosio Tedesco

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2016

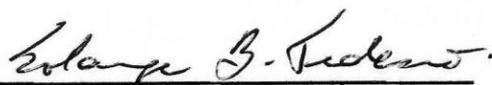
1. Vassourinha 2. Bioensaios 3. Teste de *Allium cepa*
4. Teste de *Lactuca sativa* I. Bosio Tedesco, Solange II.
Título.

Marina Pasqualli

**POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO, ANTIGENOTÓXICO E ANÁLISE
FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS AQUOSOS E DO ÓLEO DE *Baccharis
dracunculifolia* DC. (ASTERACEAE)**

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

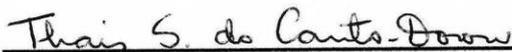
Aprovado em 29 de julho de 2016:



Solange Bosio Tedesco, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Viviane Dal-Souto Frescura, Dra. (UFSM)



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

**Santa Maria, RS
2016**

Dedico aos meus pais. É para eles e por eles, todos os esforços e todas as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Às forças divinas, Deus e Nossa Senhora de Fátima, por serem minha fonte protetora e consoladora em cada passo dado e a cada dificuldade encontrada.

À minha mãe, Maria Paulina, por ser esse exemplo forte de mãe e mulher, da qual tenho muito orgulho de dizer que sou filha. Mãe, todas as provações desses últimos dois anos vieram nos fazer mais fortes e unidas. A senhora é meu exemplo de vida.

Ao meu pai, Enio, que também sempre acreditou no meu potencial e sempre incentivou minha caminhada no âmbito acadêmico.

Aos meus irmãos, Sandra e Afrânio, pelo apoio e carinho.

À professora Solange, que carinhosamente me acolheu e não mediu esforços para que eu pudesse desenvolver esse trabalho. Serei eternamente grata por ter sido abençoada com uma orientadora não só no laboratório, mas como 'orientadora de vida'.

À professora e co-orientadora Dr^a Liliana Essi, pela fundamental ajuda com as coletas de material e outras atividades relacionadas ao trabalho.

As queridas amigas de vida e de Laboratório, Micheli e Kássia, pelo apoio, alegria e companheirismo desses dois anos.

As demais amigas de LabCitogen: Carmine, Luísa, Andrielle, Marília, Suany e Jéssica, por terem me recebido com muito carinho e por tornarem meus dias de trabalho mais alegres.

Aos demais amigos que sempre estiveram me apoiando e me incentivando, principalmente nos momentos mais difíceis dessa caminhada.

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

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

À Universidade Federal de Santa Maria e ao programa de Pós-Graduação em Agrobiologia pelo apoio intelectual, e a CAPES, pelo apoio financeiro.

Meus sincero MUITO OBRIGADA!

RESUMO

POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO, ANTIGENOTÓXICO E ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS AQUOSOS E DO ÓLEO DE *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae)

AUTORA: Marina Pasqualli
ORIENTADORA: Solange Bosio Tedesco

Baccharis dracunculifolia DC. é uma espécie medicinal, conhecida popularmente como vassourinha, e tem sua utilização baseada no preparo de infusões das folhas para o tratamento de distúrbios gástricos, cansaço físico, inapetência, afecções febris e debilidade orgânica. Seu óleo essencial se destaca na indústria de perfumaria, bem como em estudos biológicos. O trabalho teve por objetivos avaliar o potencial antiproliferativo, genotóxico e antigenotóxico de duas populações de *B. dracunculifolia* sobre os sistemas teste de *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L., bem como realizar a análise fitoquímica do extrato aquoso e do óleo obtidos a partir das folhas. O material utilizado no preparo das infusões e do óleo constou de duas populações coletadas em Santa Maria (SM) e São Pedro do Sul (SPS), do qual parte foi desidratado para preparo das infusões nas concentrações 5g.L⁻¹ e 10g.L⁻¹ e outra parte foi congelada para posterior extração do óleo essencial. Para determinação das atividades antiproliferativa, genotóxica e antigenotóxica, foi avaliado o efeito dos extratos aquosos e do óleo sobre os sistemas teste de *A. cepa* e *L. sativa*. O experimento com *A. cepa* constou de doze grupos de quatro bulbos, cada grupo correspondendo a um tratamento. Os bulbos foram enraizados em água e posteriormente submetidos aos tratamentos por 24 horas. O experimento com *L. sativa* constou de nove grupos de quatro placas de Petri, cada grupo correspondendo a um tratamento, onde foram dispostas 50 sementes por placa. Cada placa foi embebida com aproximadamente 7 mL de extrato, os quais ficaram em contato com as sementes por 72 horas. Após esse período as raízes de *A. cepa* e as sementes de *L. sativa* foram coletadas, fixadas em Carnoy 3:1 e armazenadas sob refrigeração em etanol 70% até o preparo das lâminas. A determinação dos compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos foi realizada pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os compostos do óleo essencial foram determinados pela técnica de Cromatografia Gasosa (CG). Os dados obtidos da análise de genotoxicidade foram submetidos ao teste Qui-quadrado, enquanto que, os dados da análise cromatográfica foram submetidos ao teste de Tukey (p<0,05). Os resultados do teste de *A. cepa* demonstraram que os extratos de *B. dracunculifolia* possuem potencial antiproliferativo e antigenotóxico, bem como o óleo essencial da população de SPS, enquanto que o óleo da população SM induziu a proliferação celular. Para o teste de *L. sativa*, os extratos aquosos das duas populações demonstraram efeito antiproliferativo, com exceção do extrato aquoso da população SPS na concentração de 10 g.L⁻¹, no qual houve um aumento da proliferação celular. As análises cromatográficas indicaram como compostos majoritários, o ácido *p*-cumárico para os extratos aquosos e o E-nerolidol para o óleo essencial.

Palavras-chave: Vassourinha, Bioensaios, Teste *Allium cepa*, Teste *Lactuca sativa*.

ABSTRACT

ANTIPROLIFERATIVE POTENTIAL, ANTIGENOTOXIC AND PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF AQUEOUS EXTRACTS AND OIL OF *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae)

AUTHOR: Marina Pasqualli
ADVISER: Solange Bosio Tedesco

Baccharis dracunculifolia is a medicinal species, popularly known as broom, and has its use based on the preparation of infusions of leaves for the treatment of gastric disorders, physical fatigue, lack of appetite, fever diseases and organic weakness. Its essential oil stands out in the perfumery industry as well as in biological studies. The study aimed to evaluate the potential antiproliferative, genotoxic and antigenotoxic of two populations of *B. dracunculifolia* on the test systems *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. as well as performs the phytochemical analysis of the aqueous extract and oil obtained from the leaves. The material used in the preparation of infusions and oil consisted of two populations collected in Santa Maria (SM) and São Pedro do Sul (SPS), which part was dehydrated to prepare infusions in 5g.L⁻¹ and 10g.L⁻¹ concentrations, and the other part was frozen for later extraction of essential oil. To determine the antiproliferative, genotoxic and antigenotoxic activities, the effects of aqueous extracts and oil on the *A. cepa* test and *L. sativa* systems. The experiment with *A. cepa* consisted of twelve groups of four bulbs, each group corresponding to a treatment. The bulbs were rooted in water and then subjected to treatments for 24 hours. The experiment with *L. sativa* consisted of nine groups of four Petri dishes. Each plate was soaked with about 7 mL of extract, which were in contact with the seeds for 72 hours. After this period the roots of *A. cepa* and *L. sativa* seeds were collected, fixed in Carnoy 3:1 and stored in refrigerated in 70% ethanol until the preparation of the slides. The determination of phenolic compounds from aqueous extracts was performed by the High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The compounds of the essential oil were determined by Gas Chromatography (GC). The genotoxicity data were subjected to analysis Chi-square test, whereas the data of the chromatographic analysis were subjected to Tukey test ($p < 0.05$). The results of the *A. cepa* test showed that extracts from *B. dracunculifolia* have antiproliferative and antigenotoxic potential as well as the essential oil of the SPS population, while the oil SM population induces cell proliferation. For *L. sativa* test, aqueous extracts of the two populations demonstrated antiproliferative effect, except the aqueous extract of SPS population at a concentration of 10 g.L⁻¹, in which there was an increase in cell proliferation. Chromatographic analysis indicated as major compounds, p-coumaric acid to the aqueous extracts and E-nerolidol to the essential oil.

Key words: Broom, bioassay, *Allium cepa* test, *Lactuca sativa* test.

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 – Número de células meristemáticas de *Allium cepa* L. analisadas em interfase, em divisão, e os índices mitóticos (IM) dos controles e tratamentos com extratos aquosos das folhas de *Baccharis dracunculifolia* DC., bem como tratamentos de recuperação.....27
- TABELA 2 – Número de células meristemáticas de *Allium cepa* L. analisadas em interfase, em divisão, e o número de células com alterações para os tratamentos com extratos aquosos das folhas de *Baccharis dracunculifolia* DC., bem como os tratamentos de recuperação.....29
- TABELA 3 – Número de células meristemáticas de *Allium cepa* L. analisadas em interfase, em divisão, e os índices mitóticos (IM) dos controles e tratamentos com óleo das folhas de *Baccharis dracunculifolia* DC. na concentração de 0,05%.....30
- TABELA 4 – Número de células meristemáticas de *Allium cepa* L. analisadas em interfase, em divisão, e o número de células com alterações para os tratamentos com óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. na concentração de 0,05%.....31
- TABELA 5 – Número de células de *Lactuca sativa* L. analisadas em interfase, em divisão, e os índices mitóticos (IM) dos controles e tratamentos com extratos aquosos das folhas de *Baccharis dracunculifolia* DC., bem como os tratamentos de recuperação.....33
- TABELA 6 – Compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos das folhas de *Baccharis dracunculifolia* DC. de duas populações, Santa Maria (SM) e São Pedro do Sul (SPS), em duas diferentes concentrações, obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....37
- TABELA 7 – Compostos fenólicos presentes no óleo essencial das folhas de *Baccharis dracunculifolia* DC. de duas populações, Santa Maria (SM) e São Pedro do Sul (SPS), na concentração de 0,05%, obtidos por Cromatografia Gasosa.....38

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1- Aspecto da população de *Baccharis dracunculifolia* DC. coletada no município de Santa Maria.....15
- FIGURA 2 – Bulbos de cebola em contato com os extratos aquosos e óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC.....21
- FIGURA 3 – Sistema teste *in vivo* de alface em contato com os extratos aquosos e óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC.....22
- FIGURA 4 – A seta em **a** indica alteração cromossômica e a seta em **d** indica uma metáfase regular de células de *Allium cepa* L. submetidas ao tratamento com óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. da população São Pedro do Sul. A seta em **b** indica alteração cromossômica em células de *Allium cepa* L. no tratamento com etanol 70%. A seta **c** indica alteração cromossômica nas células de *Allium cepa* L. submetidas ao tratamento de recuperação com extratos de *Baccharis dracunculifolia* DC. na concentração de 5 g.L⁻¹. Escala 10 µm.....32
- FIGURA 5 – Perfil representativo da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos extratos aquosos das folhas de *Baccharis dracunculifolia* DC.....35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 FAMÍLIA ASTERACEAE E GÊNERO BACCHARIS	14
2.2 <i>BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA</i> DC. E SUA UTILIZAÇÃO MEDICINAL.....	15
2.3 <i>BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA</i> DC. E SEU ÓLEO ESSENCIAL.....	16
2.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA NA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS	16
2.5 ESTUDOS GENOTÓXICOS SOBRE SISTEMAS TESTE <i>IN VIVO</i> – TESTE DE <i>ALLIUM CEPA</i> L. E <i>LACTUCA SATIVA</i> L.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	18
3.2 PREPARO DOS EXTRATOS AQUOSOS	19
3.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	19
3.4 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR E GENOTOXICIDADE PELO TESTE <i>IN VIVO</i> DE <i>ALLIUM CEPA</i> L.....	19
3.5 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR E GENOTOXICIDADE PELO TESTE <i>IN VIVO</i> DE <i>LACTUCA SATIVA</i> L.....	21
3.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	23
3.6.1 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ATRAVÉS DA CLAE.....	24
3.7 CROMATOGRAFIA GASOSA (CG).....	25
3.7.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).....	25
3.7.2 Identificação dos componentes.....	25
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 SISTEMA TESTE DE <i>ALLIUM CEPA</i> L.....	26
4.2 SISTEMA TESTE DE <i>LACTUCA SATIVA</i> L.....	31
4.3 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS.....	35
4.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	35
4.3.2 Cromatografia gasosa	37
5 CONCLUSÃO	39

1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade da flora brasileira reserva um grande potencial de utilização desde os primórdios das civilizações, tornando-se assim uma fonte de interesse e descoberta de novas substâncias. Esse interesse particular nos produtos fitoquímicos é derivado da considerável procura por fitoterápicos pela população para o tratamento de doenças.

O uso de plantas medicinais com fins terapêuticos, decorrente da percepção empírica de automedicação pelas civilizações antigas é transmitido aos dias atuais, promovendo melhorias na saúde e na qualidade de vida da população (PIRIZ et al., 2013). A importância de utilização dessas plantas com propriedades médicas como forma de tratamento data de cinco mil anos, sendo que, no Brasil, seu emprego é derivado de práticas indígenas (ALVES; SILVA, 2003).

O conhecimento acumulado sobre as plantas medicinais abre uma opção alternativa de tratamento terapêutico (SCHEFFER et al., 1999). A eficácia na resposta observada pelo uso de plantas bioativas contribui para que suas propriedades sejam divulgadas, mesmo que seus constituintes químicos não estejam claramente discriminados. Assim, os usuários de plantas medicinais mantêm a tendência no uso de fitoterápicos, validando as informações terapêuticas acumuladas durante séculos (MACIEL et al., 2002).

Dentre as espécies medicinais nativas utilizadas na medicina popular, merece destaque *Baccharis dracunculifolia* DC. Essa espécie, conhecida popularmente no Rio Grande do Sul como vassourinha, pode ser utilizada no preparo de infusões para combater distúrbios gástricos, cansaço físico, inapetência, afecções febris e debilidade orgânica (MORS et al., 2000). Seu óleo essencial é utilizado na indústria de perfumaria (COSTA, 2009) e também em estudos sobre atividades biológicas (FERRONATTO et al., 2006; VERDI et al., 2005).

Para uma utilização consciente e segura das plantas medicinais, são necessários estudos complementares que avaliem o potencial genotóxico e citotóxico das substâncias produzidas por essas plantas. Essas avaliações podem ser feitas utilizando-se organismos bioindicadores, auxiliando na identificação de possíveis alterações celulares e cromossômicas decorrentes do uso de algumas espécies medicinais pela população.

O monitoramento do potencial mutagênico e/ou citotóxico de substâncias pode ser feito pelo sistema teste de *Allium cepa* (cebola), sendo este, validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (PISQ, OMS) e pelo Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) como um eficiente teste para análise *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999).

O teste de *Allium cepa* tem sido preferencialmente usado para detectar prováveis efeitos tóxicos que as plantas medicinais podem apresentar sobre outros organismos. Esses efeitos podem ser observados nas células meristemáticas de *A. cepa* pois, o contato direto das raízes com os extratos vegetais permite avaliar os possíveis danos ao DNA (TEDESCO; LAUGHINGHOUSE, 2012). Autores como Vicentini et al. (2001) e Teixeira et al. (2003) demonstraram relação positiva entre testes que usaram células de *A. cepa* e células de mamíferos.

Os efeitos dos extratos aquosos de plantas medicinais sobre o ciclo celular de *A. cepa* têm sido reportados por vários autores, tais como: Kuhn et al. (2015) estudando *Eugenia uniflora* L., Neves et al. (2014), pesquisando *Phyllanthus niruri* L. e Souza et al. (2010), examinando *Artemisia verlotorum* Lam. Esses autores observaram que os principais efeitos dos extratos sobre as células meristemáticas são genotoxicidade e antigenotoxicidade, além da diminuição da proliferação celular. Enquanto, os efeitos dos óleos essenciais são demonstrados por Pinheiro (2016) e Frescura (2014), estudando *Rosmarinus officinalis* L., os quais observaram efeitos antiproliferativo e genotóxico do óleo essencial dessa espécie.

Além disso, outro bioteste relevante que pode auxiliar na detecção de genotoxicidade e citotoxicidade de substâncias presentes nos extratos de plantas medicinais é o que utiliza *Lactuca sativa* (alface) como organismo-alvo. Com este teste, pode-se avaliar tanto a germinação das sementes como danos aos cromossomos. Segundo estudo realizado por Souza (2005), *L. sativa* demonstra sensibilidade à presença de aleloquímicos, mesmo que estes se apresentem em baixas concentrações.

Dentre os materiais disponíveis para a realização de testes vegetais, deve-se atentar quanto à necessidade de que esse organismo-teste seja sensível à exposição dos compostos em estudo e esteja em constante divisão mitótica, pois, a partir da divisão celular será possível observar os efeitos tóxicos e alterações cromossômicas ocorridas durante o processo de divisão celular (SOUZA, 2005).

Para complementar as informações sobre os extratos de plantas medicinais é necessário que se proceda uma análise mais detalhada para conhecimento dos

compostos presentes nos mesmos. Nesse caso, dispõe-se de estudos fitoquímicos, os quais buscam conhecer os compostos químicos das plantas, bem como o grupo de metabólitos mais relevante. Assim, métodos eficazes, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a Cromatografia Gasosa (CG) são usados para extração, isolamento e purificação dos constituintes químicos dos extratos e dos óleos essenciais (Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Medicinais – NEPLAME). Sendo possível, dessa forma, obter um parâmetro comparativo para reconhecimento de semelhanças e diferenças entre extratos submetidos às mesmas condições de análise (ALAERTS et al., 2007; TEDESCO, 2015).

O primeiro estudo fitoquímico utilizando a parte aérea de *B. dracunculifolia* foi realizado por Bohlmann et al. (1981), onde foram identificados os fenilpropanóides drupanina, bacularina e artepilina C. Posteriormente, Park et al. (2002), evidenciaram por meio de análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência das folhas de *B. dracunculifolia* a presença dos fenilpropanóides ácido cumárico e ácido ferúlico, além dos flavonóides canferol, apigenina, isosacuranetina, pinocembrina, crisina, galangina e canferide. Além disso, um estudo realizado por Park et al. (2004), demonstrou diferença na composição química dos extratos hidroalcoólicos de brotos, folhas jovens e folhas maduras de *B. dracunculifolia*. Outros estudos fitoquímicos realizados por Fukuda et al. (2006) verificaram a presença de mono e sesquiterpenos nas partes aéreas da planta, alguns dos quais também se fizeram presentes no óleo essencial.

Tendo em vista a importância que essa espécie representa como fonte alternativa medicamentosa e como produtora de óleo essencial, evidencia-se a necessidade de estudos complementares que informem sobre os possíveis efeitos genotóxico, antigenotóxico e antiproliferativo tanto do extrato aquoso como do óleo essencial de *B. dracunculifolia*. Essa necessidade de pesquisas que promovam o conhecimento das potencialidades citotóxicas encontradas nessa espécie visa contribuir para a melhor utilização desta em prol da saúde humana.

O presente estudo teve por objetivos avaliar o potencial antiproliferativo, genotóxico e antigenotóxico do extrato aquoso e do óleo, obtidos a partir das folhas de duas populações de *Baccharis dracunculifolia*, através da observação de possíveis alterações cromossômicas, redução de alterações cromossômicas e da inibição da divisão celular em *Allium cepa* e em *Lactuca sativa* submetidos ao óleo e ao extrato aquoso em diferentes concentrações, bem como, realizar a análise fitoquímica do extrato aquoso e do óleo de duas populações de *B. dracunculifolia*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA ASTERCEAE E GÊNERO BACCHARIS

A família Asteraceae é composta pelo maior número de espécies dentro do grupo das Angiospermas, constituindo-se por cerca de 23.000 espécies, 1.535 gêneros e 17 tribos (CANCELLI et al., 2007). É constituída por ervas perenes, subarbustos e arbustos, com ocorrência também de ervas anuais, lianas e árvores (MONDIN, 2006).

Plantas dessa família podem ser encontradas nos mais diversos ecossistemas e variações climáticas, desde regiões tropicais, subtropicais até temperadas, devido a sua capacidade de adaptação ambiental (CANCELLI et al., 2007). Além disso, são muito estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica, sendo alguns dos seus compostos utilizados na produção de fármacos, inseticidas, entre outros (VERDI et al., 2005).

O gênero *Baccharis*, muito importante dentro dessa família é conhecido popularmente por carqueja, vassourinha ou alecrim do campo. Inclui mais de 500 espécies que estão distribuídas dos Estados Unidos à Argentina. Aproximadamente 120 espécies são encontradas na região sudoeste do Brasil, e sua grande concentração, tanto no Brasil quanto nos Andes, indica que essa área seja o provável centro de origem do táxon (BUDEL et al., 2004).

Seu estimado valor socioeconômico se dá pela utilização de suas folhas, as quais são consumidas geralmente na forma de chás com indicações para males do estômago, fígado, anemias, inflamações, diabetes, doenças na próstata. Algumas espécies são descritas também para processos de desintoxicação do organismo, sendo tais indicações devido a sua composição fitoquímica, que apresenta flavonóides, diterpenos, triterpenos, cromenos, etc. (ABREU; ONOFRE, 2010; LAGO et al., 2008; VERDI et al., 2005).

Cerca de 15% das espécies desse gênero tem sido estudada do ponto de vista fitoquímico devido sua alta produção de metabólitos secundários, sendo que os óleos essenciais extraídos das folhas de *Baccharis dracunculifolia* DC. (óleo-de-vassoura) e de *Baccharis trimera* (Less.) DC. (óleo-de-carqueja) possuem alto valor para indústria de fragrâncias (AGOSTINI et al., 2005; VERDI et al., 2005).

2.2 *BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA* DC. E SUA UTILIZAÇÃO MEDICINAL

Baccharis dracunculifolia DC. é uma espécie arbustiva nativa da América do Sul, de grande ocorrência no Brasil, de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul (FERRONATO et al., 2007). É conhecida popularmente como “alecrim do campo, alecrim vassoura, carqueja, chilca, cilca, erva-de-são-joão-maria, suncho, thola, vassoureira ou vassourinha” (CANTON; ONOFRE, 2010) e seu aspecto em ambiente natural pode ser observado na Figura 1.



FIGURA 1- Aspecto da população de *Baccharis dracunculifolia* DC. coletada no município de Santa Maria. Fonte: arquivo pessoal.

Essa planta pode atingir até 4 metros de altura, sendo uma espécie perene, dioica e reproduzida por sementes. Suas folhas apresentam tricomas tectores e glandulares que além de atuarem como barreira protetora ao ataque de predadores, auxiliam na interação dessa espécie com as abelhas que coletam seu material resinoso (SFORCIN et al., 2012; SPRING, 2000; TEIXEIRA et al., 2005). Essa interação também é devida a produção de óleo essencial que possui aroma forte e exótico, que são atrativos para as abe (SFORCIN et al., 2012).

Na medicina popular, sua importância deriva da utilização de suas folhas na forma de infusões para combater distúrbios gástricos, cansaço físico, inapetência, afecções febris e debilidade orgânica (MORS et al., 2000). Outra fonte muito estimada

de produtos fitoterápicos que podem ser extraídos dessa planta é devida a sua interação com as abelhas, da qual é produzida a própolis verde (NASCIMENTO et al., 2008).

2.3 *BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA* DC. E SEU ÓLEO ESSENCIAL

Óleos essenciais, também conhecidos como óleos voláteis podem ser obtidos de diversas partes da planta, e dentre as técnicas disponíveis para sua extração tem-se a destilação por arraste com vapor d'água. Esses extratos são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (SIMOES; SPITZER, 1999). São considerados óleos por, geralmente, apresentarem aparência oleosa à temperatura ambiente, e chamados de essências pelo aroma agradável e intenso da maioria dos seus compostos. Alguns constituintes dos óleos essenciais apresentam-se em maiores concentrações, sendo estes conhecidos como componentes principais e aqueles encontrados em menores concentrações, são denominados componente traço (VITTI; BRITO, 2003).

O óleo essencial extraído de plantas de *B. dracunculifolia*, conhecido como óleo-de-vassoura, é produzido no Brasil em pequena escala pela indústria de perfumaria, proporcionando um aroma exótico a diversos perfumes (COSTA, 2009), além de ser utilizado em estudos sobre atividades biológicas referentes a efeitos alelopático, antioxidante, antimicrobiano e anti-inflamatório (FERRONATTO et al., 2006; VERDI, et al., 2005).

2.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA NA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS

Os produtos obtidos da extração de componentes vegetais não estabelecem um padrão em sua composição química, uma vez que a bioatividade desses compostos extraídos está diretamente relacionada com a planta, podendo variar desde a espécie, idade ou parte da planta utilizada, bem como as condições de solo e de colheita. Além disso, o método de extração e secagem e o tipo de solvente utilizado para extração também poderão afetar a composição final do produto. Sendo assim fazem-se necessários o estabelecimento e padronização dos compostos extraídos para que haja eficácia em sua utilização (HENDRIKS et al., 2005).

Essa padronização pode ser feita com auxílio de técnicas cromatográficas, sendo que a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é um instrumento que permite análises

quantitativas e qualitativas de misturas complexas com alta resolução e sensibilidade (PAIVA et al., 2002). Outra ferramenta analítica disponível para identificação de compostos em misturas complexas é a Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas, sendo amplamente utilizada na identificação e caracterização de compostos voláteis (VIEGAS; BASSOLI, 2007).

2.5 ESTUDOS GENOTÓXICOS SOBRE SISTEMAS TESTE *IN VIVO* – TESTE DE *Allium cepa* L. E *Lactuca sativa* L.

Sistemas testes vegetais, principalmente de *Allium cepa* L., têm sido utilizados para o estudo dos efeitos de extratos vegetais, visando à detecção de genotoxicidade (PINHEIRO, 2016; PASQUALLI et al., 2015; TRAPP et al., 2015). O sistema teste de *A. cepa* foi utilizado pela primeira vez por Levan (1938) para detecção da genotoxicidade. As primeiras adaptações realizadas no sistema *A. cepa*, são resultado do trabalho desenvolvido por Fiskesjö (1985), para utilização no monitoramento ambiental, avaliação de compostos solúveis e insolúveis em água até avaliação de efeitos de misturas complexas. Com o tempo, novas metodologias foram adaptadas para possibilitar o monitoramento da genotoxicidade não apenas em substâncias simples, mas também em outros compostos mais complexos, que hoje são encontrados na natureza devido à ação humana.

O teste com *A. cepa* é considerado eficiente para observação da ocorrência de citotoxicidade e genotoxicidade, pois de acordo com Matsumoto et al. (2006), para que um organismo seja eficiente no processo de avaliação, seus cromossomos devem ser fáceis de analisar em termos de tamanho, número e morfologia, e os cromossomos de *A. cepa*, satisfazem essas necessidades.

Estudando o efeito de plantas medicinais sobre células meristemáticas de *A. cepa*, Neves et al. (2014) observaram que as infusões dos extratos de *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra) em todas as concentrações testadas (0,02 mg.mL⁻¹, 0,04 mg.mL⁻¹, 0,06 mg.mL⁻¹ e 0,08 mg.mL⁻¹) promoveram uma redução significativa no índice mitótico.

Outras espécies também são utilizadas como organismo-alvo, a exemplo das sementes de *Lactuca sativa* L. e *Eruca sativa* Mill. (rúcula) (SOUZA, et al., 2005). Nesses ensaios, os parâmetros normalmente avaliados são a germinação e o comprimento do sistema radicular (BELINELO et al., 2008), mas outras variáveis

podem ser observadas, como mostram os estudos realizados por Frescura et al. (2012) e Souza et al. (2005), no qual os autores avaliaram também o índice mitótico (IM) e o índice de velocidade de germinação (IVG).

Bezerra et al. (2008), avaliando o potencial alelopático do extrato etanólico do óleo de *Carapa guianenses* Aubl. (andiroba) sobre a germinação de sementes de *L. sativa*, observaram que além da inibição da germinação das sementes, o extrato promoveu um retardo no crescimento das plântulas, bem como alterações morfológicas nas radículas e hipocótilos. Já Solano et al. (2015) observaram que além da redução do índice mitótico, os extratos aquosos de *Hymenea coubaril* L. causaram alterações cromossômicas e morte celular em células meristemáticas de *L. sativa*.

Os efeitos de infusões de plantas medicinais sobre raízes de *A. cepa* também foram observados por outros autores, tais como: FRESCURA et al., 2012; DALLA NORA et al., 2010; SOUZA et al., 2010 e sobre sementes de *L. sativa*, a exemplo de OLGUIN et al., 2005; SOUZA et al. 2005a; GIOTTO et al., 2007), demonstrando a ocorrência de genotoxicidade, alelopatia e redução do índice mitótico dos organismos alvo submetidos aos tratamentos com diferentes espécies medicinais, tais como: *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., *Mikania glomerata* Spreng., *Artemisia verlotorum* Lamotte, *Vernonia tweediana* Baker., *Cymbopogon citratus* DC., *Stevia rebaudiana* Bert. e *Eugenia dysenterica* DC.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BOTÂNICO

Folhas frescas e ramos jovens de duas populações de *Baccharis dracunculifolia* DC. foram coletados nos municípios de Santa Maria (População 1 – S 29° 37' 26,67'' W 53° 52' 24,87'') e São Pedro do Sul (População 2 – 29° 32' 53,65'' W 54° 15' 09,97''), Rio Grande do Sul. As duas populações foram coletadas na mesma época, em período de floração. Em laboratório, uma parte do material foi desidratado (secagem em temperatura ambiente) para preparação dos extratos aquosos, e a outra parte congelada fresca, para posterior extração de óleo essencial.

O material coletado foi devidamente identificado pela Prof^a Dr^a Liliana Essi, segundo normas usuais em taxonomia (MORI et al., 1989), coletando-se um indivíduo

por população para testemunho de pesquisa. Tais testemunhos estão registrados no herbário SMDB (herbário Santa Maria Departamento de Biologia), sob os números de registro 16.058 e 16.281, para as populações Santa Maria e São Pedro do Sul, respectivamente.

3.2 PREPARO DOS EXTRATOS AQUOSOS

Os extratos aquosos de *B. dracunculifolia* foram preparados por meio de infusão de folhas secas em água destilada, nas concentrações de 5 g.L⁻¹ e 10 g.L⁻¹. Essas concentrações foram escolhidas levando-se em consideração que a dosagem normal de preparo de chás é de 10 g.L⁻¹, sendo que esta concentração pode variar conforme o tipo de material vegetal utilizado para o preparo dos extratos (FRANCO; FONTANA, 2011).

Os extratos aquosos permaneceram em infusão durante 10 minutos. Após esse período, os extratos foram coados e, após atingirem temperatura ambiente, foram utilizados para o tratamento dos bulbos de *A. cepa*, previamente enraizados em água destilada, e germinação das sementes de *L. sativa*. Parte desta infusão foi enviada para análise dos compostos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

3.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

A extração do óleo essencial a partir de folhas frescas congeladas de *B. dracunculifolia* foi realizada pela técnica de arraste por vapor d'água com o aparelho de Clevenger modificado (SIMÕES et al., 2004), por um período de 4 horas. O óleo extraído foi diluído em etanol até obter-se a concentração de 0,05%.

Essa etapa de extração do óleo foi realizada no Laboratório de Farmácia Industrial do Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências de Saúde (CCS), UFSM, com a colaboração da Prof^a Dr^a Cristiane de Bona Silva.

3.4 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR E GENOTOXICIDADE PELO TESTE *IN VIVO* DE *Allium cepa* L.

As células meristemáticas das radículas de *A. cepa* foram utilizadas como sistema teste para determinar os índices mitóticos e avaliar as alterações morfológicas e estruturais nos cromossomos e para determinar os índices mitóticos.

Na primeira etapa, foram colocados 12 grupos de 4 bulbos para enraizar em água destilada, os quais constituirão os 12 tratamentos com 4 repetições para cada uma das populações coletadas. Os tratamentos para análise de genotoxicidade foram os seguintes:

- T1- Controle negativo em água destilada;
- T2- Extrato aquoso de folhas de *Baccharis dracunculifolia* por infusão de 5 g.L⁻¹ (população 1);
- T3- Extrato aquoso de folhas de *B. dracunculifolia* por infusão de 10 g.L⁻¹ (população 1);
- T4- Extrato aquoso de folhas de *B. dracunculifolia* por infusão de 5 g.L⁻¹ (população 2);
- T5- Extrato aquoso de folhas de *B. dracunculifolia* por infusão de 10 g.L⁻¹ (população 2);
- T6 - Etanol (controle da diluição do óleo);
- T7- Óleo de *B. dracunculifolia* 0,05% (população 1);
- T8- Óleo de *B. dracunculifolia* 0,05% (população 2);
- T9 - Glifosato 2% (controle positivo);
- T10- Glifosato 2% + 24 horas em água destilada;
- T11- Glifosato 2% + 24 horas no extrato aquoso de folhas de *B. dracunculifolia* por infusão 5 g.L⁻¹ (verificação da atividade antígenotóxica – população 1);
- T12- Glifosato 2% + 24 horas no extrato aquoso de folhas de *B. dracunculifolia* por infusão 10 g.L⁻¹ (verificação da atividade antígenotóxica – população 1).

Todos os grupos de bulbos foram enraizados em água destilada por 72 horas, e após, submetidos aos tratamentos por 24 horas (Figura 2). Decorrida esta etapa, as raízes foram coletadas e fixadas em etanol: ácido acético (3:1) por 24 horas e posteriormente armazenadas sob refrigeração em etanol 70% até sua utilização para confecção das lâminas.

Para análise da divisão celular das raízes dos bulbos de cebola submetidas aos diferentes tratamentos foram preparadas lâminas. Primeiramente as raízes foram hidrolisadas em HCl 1N por 5 minutos, posteriormente lavadas em água destilada e coradas com orceína acética 2% (metodologia adaptada de GUERRA e SOUZA, 2002). A região meristemática foi esmagada com auxílio de um pequeno bastão de vidro e sobre o material colocada a lamínula. As lâminas foram observadas ao microscópio com

o aumento de 40X, e então analisadas. Duas lâminas foram preparadas por bulbo, analisando-se 500 células por lâminas e 1000 células por bulbo (repetição), totalizando 4000 células por tratamento para cada uma das populações em estudo. O cálculo do índice mitótico (IM) foi realizado baseando-se na porcentagem de células em divisão.



FIGURA 2 – Bulbos de cebola em contato com os extratos aquosos e óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. Fonte: Arquivo pessoal.

O controle positivo utilizado foi o glifosato, pois alguns autores como Tedesco et al. (2015) e Trapp et al. (2015), demonstraram que este herbicida, amplamente utilizado na agricultura, induz alterações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa*. Para observação de possível atividade antígenotóxica foram utilizados os bulbos que depois de submetidos ao glifosato 2% (mutações induzidas do tipo cromossômicas estruturais) foram colocados em água para controle e posteriormente nos extratos de *B. dracunculifolia* por 24 horas para verificação do potencial antígenotóxico, através da observação da minimização de danos aos cromossomos de *A. cepa*.

3.5 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR E GENOTOXICIDADE PELO TESTE *IN VIVO* DE *Lactuca sativa* L.

Para esta análise, foram utilizadas 4 placas de petri por tratamento (repetições) onde foram dispostas 50 sementes de *L. sativa* (cultivar regina) em cada placa, constituindo os seguintes tratamentos:

- T1- Controle negativo em água destilada;

- T2- Extrato aquoso de folhas de *Baccharis dracunculifolia* por infusão de 5 g.L⁻¹ (população 1);
- T3- Extrato aquoso de folhas de *B. dracunculifolia* por infusão de 10 g.L⁻¹ (população 1);
- T4- Extrato aquoso de folhas de *B. dracunculifolia* por infusão de 5 g.L⁻¹ (população 2);
- T5- Extrato aquoso de folhas de *B. dracunculifolia* por infusão de 10 g.L⁻¹ (população 2);
- T6 - Glifosato 2% (controle positivo);
- T7- Glifosato 2% + 24 horas no extrato aquoso de folhas de *B. dracunculifolia* por infusão 5 g.L⁻¹ (verificação da atividade antígenotóxica – população 1);
- T8- Glifosato 2% + 24 horas no extrato aquoso de folhas de *B. dracunculifolia* por infusão 10 g.L⁻¹ (verificação da atividade antígenotóxica – população 1).

As placas de Petri foram forradas com papel filtro duplo embebido com aproximadamente 7 mL dos extratos de cada tratamento, onde foram colocadas as 50 sementes de *L. sativa*. As placas de petri foram colocadas em câmara de germinação por 72 horas, com fotoperíodo diário de 24 horas e mantidas a uma temperatura constante de aproximadamente 25°C (Figura 3). Após as 72 horas de exposição aos extratos, as sementes germinadas foram coletadas e fixadas em etanol: ácido acético (3:1) por 24 horas e conservadas em geladeira no etanol 70% até a utilização.



FIGURA 3 – Sistema teste *in vivo* de alfaca em contato com os extratos aquosos e óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. Fonte: Arquivo pessoal.

Para confecção das lâminas, as raízes foram hidrolisadas em HCl 1N por 5 minutos, lavadas em água destilada e coradas com orceína acética 2% (metodologia adaptada de GUERRA e SOUZA, 2002). A região meristemática foi esmagada com o auxílio de um pequeno bastão de vidro e sobre o material colocada a lamínula. As lâminas foram observadas ao microscópio com o aumento de 40X, e então analisadas. Duas lâminas por placa foram preparadas, analisando-se 500 células por lâmina e 1000 células por repetição, totalizando 4000 células para cada um dos tratamentos. A seguir, o índice mitótico (IM) foi calculado baseando-se na porcentagem de células em divisão.

Os experimentos para verificação de genotoxicidade foram desenvolvidos no Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

3.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A cromatografia líquida foi empregada para a determinação dos compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos das folhas das duas populações de *B. dracunculifolia*, e sua análise foi realizada no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia Industrial do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM.

3.6.1 Produtos químicos, aparelhos e procedimentos gerais.

Todos os produtos químicos utilizados foram de grau analítico. Acetonitrila (ou cianeto de metila), ácido fórmico, ácido gálico, ácido p-cumárico e ácido clorogênico foram comprados da Merck (Darmstadt, Alemanha). Catequina, quercitina e rutina foram adquiridas da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA). A cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada com um Sistema CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japão) Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A), equipado com bombas alternativas Shimadzu LC-20AT, conectadas a um desgaseificador DGU 20A5 com integrador CBM 20A, diodo detector em série SPD-M20A e software LC solution 1.22 SP1.

3.6.2 Quantificação dos compostos através da CLAE

As análises cromatográficas da fase reversa foram realizadas sob condições de gradiente usando coluna C18 (4.6 mm x 150 mm) carregada com partículas de 5 µm de diâmetro. A fase móvel foi água contendo 2% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B) e a composição de gradiente foi: 17% de B até 10 min e alteradas para se obter 20%, 30%, 50%, 70% e 10% de B a 20, 30, 40, 50 e 60 min, respectivamente, de acordo com o método previamente descrito (Cruz et al., 2016).

O volume injetado foi de 20 µL e comprimento de onda de detecção foram 254 nm para os ácidos gálico e p-cumárico, 280 nm para catequina, 327 nm para o ácido clorogênico, e 366 nm para a quercetina, rutina e luteolina. As amostras e a fase móvel foram filtradas através de filtro de 0,45µM de membrana (Millipore) e, em seguida, desgaseificou-se por banho de ultrassons antes da utilização. A identificação destes compostos foi realizada comparando o seu tempo de retenção e o espectro de absorção de UV com as dos padrões comerciais.

As soluções de reserva de referências de normalização foram preparadas em fase móvel de HPLC numa gama de concentrações de 0,020-0,350 mg.mL⁻¹ para catequina, quercetina, rutina e luteolina; e 0,030-0,200 mg.mL⁻¹ de p-cumárico, clorogênico e ácido gálico. Os picos da cromatografia foram confirmados por comparação do seu tempo de retenção com os de padrões de referência e por espectros de DAD (200 a 600 nm). A curva de calibração para ácido gálico foi: $Y = 12478x + 1326.9$ ($r = 0.9998$); catequina: $Y = 11963x + 1095.7$ ($r = 0.9996$); ácido clorogênico: $Y = 12634x + 1147.3$ ($r = 0.9999$); ácido p-cumárico: $Y = 13092x + 1237.8$ ($r = 0.9998$); rutina: $Y = 11745x + 1326.9$ ($r = 0.9997$); quercetina: $Y = 13256x + 1074.9$ ($r = 0.9995$); e luteolina $Y = 12561x + 1073.2$ ($r = 0.9997$).

Todas as operações de cromatografia foram realizadas à temperatura ambiente e em triplicata. O limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foi calculado com base no desvio padrão das respostas e a inclinação por meio de três curvas de análise independentes, tal como definido por Nwanna et al. (2016). LOD e LOQ foram calculados como $3,3$ e $10 \sigma / S$, respectivamente, onde σ é o desvio padrão da resposta e S é o declive da curva de calibração.

3.7 CROMATOGRAFIA GASOSA (CG)

A cromatografia gasosa foi empregada para a determinação dos compostos fenólicos do óleo das folhas das duas populações de *B. dracunculifolia*, e sua análise foi realizada no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia Industrial do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM.

O óleo foi seco sobre sulfato de sódio anidro e, após filtração, armazenado a - 4 °C, até teste e análise cromatográfica em fase gasosa, que foi realizada utilizando um sistema Agilent Technologies 6890N GC-FID, equipado com DB-5 de coluna capilar (30 m x 0,25 mm, espessura de filme 0,25 milímetros) e ligado a um detector de FID. As temperaturas do injetor e do detector foi ajustado para 280 °C. O gás transportador foi o gás hélio, a uma taxa de fluxo de 1,3 mL.min⁻¹. O programador térmico foi de 50-300 °C a uma velocidade de 5 °C.min⁻¹. Duas réplicas de amostras foram processadas da mesma maneira. Concentrações relativas dos componentes foram calculados com base em áreas de pico GC sem o uso de fatores de correção. O volume de injeção do óleo foi de 1 µl (CUNHA et al., 2015).

3.7.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

As análises de cromatografia CG-EM foram realizadas num sistema Agilent Technologies AutoSystem XL GC-MS operando no modo EI a 70 eV, equipado com um injetor dividido/splitless (250 °C). A temperatura linha de transferência foi de 280 °C. Hélio foi utilizado como gás portador (1,3 mL.min⁻¹) e as colunas capilares utilizados foram um HP 5MS (30 m x 0,25 mm, espessura de filme 0,25 milímetros) e um HP Innowax (30 m x 0,32 milímetros de d.i., espessura do filme 0,50 milímetros). O programa de temperatura foi o mesmo que o utilizado para a análise de CG. O volume de injeção foi de 1 µl de óleo essencial.

3.7.2 Identificação dos componentes

A identificação dos componentes foi efetuada com base no índice de retenção (RI), determinado em função da série homóloga de n-alcanos, C7-C30, sob condições experimentais idênticas, em comparação com a busca da biblioteca espectros de massa (NIST e Wiley), e com a data literatura espectros de massa de Adams (1995). As

quantidades relativas dos componentes individuais foram calculadas com base na área do pico CG (FID resposta).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos pelos testes de *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. foram avaliados pelo teste Qui-quadrado (χ^2), utilizando o software Biostat versão 5.3 (AYRES, 2006).

Os resultados obtidos a partir da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey utilizando o software livre R versão 3.1.1. (R Core Team, 2014).

Para todas as comparações utilizou-se 5% de probabilidade de erro.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SISTEMA TESTE DE *Allium cepa* L.

A análise do ciclo celular pelo sistema teste *in vivo* de *Allium cepa* L. pode ser observada na Tabela 1, onde são apresentados o número total de células analisadas, células em interfase, em divisão e o respectivo índice mitótico.

Com base na Tabela 1 pode-se observar que o índice mitótico (IM) de todos os tratamentos diferiu estatisticamente do controle negativo (T1), mostrando uma redução significativa da proliferação celular de *Allium cepa* nos tratamentos testados.

A comparação dos valores dos índices mitóticos dos extratos aquosos das duas populações de *Baccharis dracunculifolia* na concentração 5 g.L⁻¹ não diferiram entre si (χ^2 : T2 x T4 = 0.017), assim como os extratos na concentração mais elevada de 10 g.L⁻¹ igualmente não foram diferentes estatisticamente (χ^2 : T3 x T5 = 2.395).

Para a população Santa Maria (SM) os extratos aquosos nas duas concentrações (5 g.L⁻¹ e 10 g.L⁻¹) diminuíram significativamente os valores dos índices mitóticos (T2 e T3) quando comparados com o controle negativo (T1), sendo os valores de χ^2 para as comparações: T1 x T2 = 207.684 e T1 x T3 = 19.828. Quando comparados com o controle positivo, apenas o tratamento T2 apresentou IM inferior ao encontrado no T9. Na população de São Pedro do Sul (SPS), o mesmo comportamento pode ser observado

para as duas concentrações testadas, apesar de, os tratamentos T5 e T9, não apresentarem diferença significativa ($\chi^2 = 0.122$).

TABELA 1 – Número de células meristemáticas de *Allium cepa* L. analisadas em interfase, em divisão, e os índices mitóticos (IM) dos controles e tratamentos com extratos aquosos das folhas de *Baccharis dracunculifolia* DC., bem como tratamentos de recuperação.

Tratamentos	Total de células analisadas	Células em interfase	Células em divisão	Índice mitótico (%)
T1 - Água destilada (controle negativo)	4000	3722	278	6,95 ^{a*}
T2 - Extrato aquoso 5 g.L ⁻¹ (SM)	4000	3970	30	0,75 ^h
T3 - Extrato aquoso 10 g.L ⁻¹ (SM)	4000	3815	185	4,63 ^{bc}
T4 - Extrato aquoso 5 g.L ⁻¹ (SPS)	4000	3971	29	0,72 ^{hi}
T5 - Extrato aquoso 10 g.L ⁻¹ (SPS)	4000	3843	157	3,92 ^{bcde}
T9 - Glifosato 2% (controle positivo)	4000	3849	151	3,78 ^{bcdef}
T10 - Recuperação em água	4000	3803	197	4,93 ^b
T11 - Recuperação extrato aquoso 5 g.L ⁻¹	4000	3839	161	4,02 ^{bcd}
T12 - Recuperação extrato aquoso 10 g.L ⁻¹	4000	3853	147	3,67 ^{bcdeg}

SM = Santa Maria; SPS = São Pedro do Sul

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste χ^2 em nível de 5% de significância.

Fonte: elaborada com base nos dados do experimento.

O controle positivo diferiu significativamente apenas entre os tratamentos T1, T2 e T4, onde os valores do χ^2 para as comparações foram: T1 x T9 = 39.727; T2 x T9 = 82.762 e T4 x T9 = 84.592.

A avaliação do efeito dos extratos aquosos de *B. dracunculifolia* pelo teste de *A. cepa* demonstrou que houve uma significativa diminuição da divisão celular, com redução dos valores dos índices mitóticos em todas as concentrações testadas nas duas populações, indicando assim, atividade antiproliferativa dos extratos aquosos da espécie. Além disso, os extratos na menor concentração (5 g.L⁻¹) apresentaram uma inibição maior da divisão celular, com IM menor que aquele observado nos extratos de maior concentração (10 g.L⁻¹).

Outros autores também verificaram atividade antiproliferativa dos extratos aquosos de diferentes espécies medicinais utilizando o sistema teste de *A. cepa* como bioindicador. Facchinetto e Tedesco (2009), estudando *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., avaliaram o potencial das infusões de duas populações nas concentrações 15 mg.mL⁻¹ e 75 mg.mL⁻¹ e observaram reduções

significativas nos valores dos índices mitóticos de células meristemáticas de *A. cepa* já na concentração usual, da mesma forma que ocorreu com os extratos aquosos de *Baccharis dracunculifolia*.

Dias et al. (2014), estudando *Mikania cordifolia* (L. F.) Willd. também observaram que os extratos aquosos das folhas de duas populações nas concentrações 8 g.L⁻¹ e 32 g.L⁻¹ apresentaram inibição significativa da divisão celular. Nesse estudo, assim como no presente trabalho, os menores valores de índices mitóticos foram encontrados nos tratamentos que receberam a menor concentração do extrato aquoso.

Ao avaliar o potencial de recuperação celular das raízes que primeiramente foram submetidas ao glifosato por 24 horas e posteriormente colocadas em recuperação nos extratos, observou-se um aumento do índice mitótico para o tratamento que se recuperou no extrato aquoso 5 g.L⁻¹ (T11) quando comparado com o tratamento que recebeu apenas o glifosato (T9). O tratamento que se recuperou em água (T7), apresentou a melhor resposta de recuperação, mostrando-se mais eficiente que os tratamentos que se recuperaram nos extratos, apesar de que os três tratamentos de recuperação não diferem estatisticamente entre si $T7 \times T8 = 3.790$, $T7 \times T9 = 7.594$, $T8 \times T9 = 0.662$. Resultado semelhante foi obtido por Frescura et al. (2013) estudando o efeito de pós tratamento dos extratos de *Psychotria brachypoda* e *Psychotria birotula* pelo teste de *Allium cepa*, sendo possível observar neste estudo que os extratos dessas plantas também reverteram parcialmente o efeito antiproliferativo causado pelo glifosato.

Na tabela 2 são apresentados os dados referentes ao comportamento genotóxico dos tratamentos. O glifosato é utilizado como controle positivo, pois tem demonstrado sua capacidade como indutor de alterações em células meristemáticas de *A. cepa* (PINHEIRO, 2016).

É possível observar que o efeito genotóxico sobre o sistema teste de *Allium cepa* foi superior nas células que ficaram em contato com o glifosato, do que nas células que receberam os extratos aquosos. É possível observar também que os tratamentos de recuperação reverteram parcialmente o efeito genotóxico do glifosato, sendo que ação antigenotóxica foi maior no tratamento que se recuperou em água. O mesmo efeito foi verificado por Frescura et al. (2013), estudando o efeito de pós tratamento com extratos de *Psychotria brachypoda*, 20 mg.L⁻¹, e *P. birotula*, 5 mg.L⁻¹.

TABELA 2 – Número de células meristemáticas de *Allium cepa* L. analisadas em interfase, em divisão, e número de células com alterações cromossômicas dos tratamentos com extratos aquosos das folhas de *Baccharis dracunculifolia* DC., bem como os tratamentos de recuperação.

Tratamento	Total de células analisadas	Células em divisão	Células com alterações
T1 - Água destilada (controle negativo)	4000	278	2 ^e
T2 - Extrato aquoso 5 g.L ⁻¹ (SM)	4000	30	0 ^f
T3 - Extrato aquoso 10 g.L ⁻¹ (SM)	4000	185	4 ^d
T4 - Extrato aquoso 5 g.L ⁻¹ (SPS)	4000	29	0 ^f
T5 - Extrato aquoso 10 g.L ⁻¹ (SPS)	4000	157	0 ^f
T9 - Glifosato 2% (controle positivo)	4000	151	25 ^{a*}
T10 - Recuperação em água	4000	197	4 ^d
T11 - Recuperação extrato aquoso 5 g.L ⁻¹	4000	161	8 ^{bc}
T12 - Recuperação extrato aquoso 10 g.L ⁻¹	4000	147	9 ^b

SM = Santa Maria; SPS = São Pedro do Sul

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste χ^2 em nível de 5% de significância.

Fonte: elaborada com base nos dados do experimento.

Os tratamentos T2, T4 e T5, que receberam os extratos aquosos não apresentaram diferença, pois os mesmos não apresentaram células com alterações. Somente o tratamento T3 (Extrato aquoso 10 g.L⁻¹) da população Santa Maria apresentou quatro células com alterações do total de células que estavam em divisão, sendo esse número, inferior ao observado no controle positivo, o qual apresentou 25 células com alterações do total de células que estavam em divisão.

Na Tabela 3, estão apresentados dados referentes aos valores dos índices mitóticos das células meristemáticas de *Allium cepa* submetidas ao óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* das duas populações estudadas. Para essa avaliação, o óleo essencial foi diluído em etanol, obtendo-se a concentração de 0,05%.

Verifica-se diferença significativa entre os controles e o óleo essencial das duas populações, a qual pode ser observada também entre as populações SM e SPS (T7 xT8, $\chi^2 = 8.856$).

Quando comparados separadamente, observa-se que o tratamento que recebeu óleo essencial da população coletada em SM (T7) aumentou significativamente a divisão celular comparado ao controle negativo (T6), sendo o valor de $\chi^2 = 1.332$, indicando assim a atividade proliferativa do óleo essencial dessa população.

TABELA 3 – Número de células meristemáticas de *Allium cepa* L. analisadas em interfase, em divisão, e os índices mitóticos (IM) dos controles e tratamentos com óleo das folhas de *Baccharis dracunculifolia* DC. (0,05%).

Tratamento	Total de células analisadas	Células em interfase	Células em divisão	Índice mitótico (%)
T1 - Água destilada (controle negativo)	4000	3722	278	6,95 ^{abc}
T6 - Etanol (controle diluição óleo)	4000	3694	306	7,65 ^{ab}
T7 - Óleo 0,05% (SM)	4000	3666	334	8,35 ^{a*}
T8 - Óleo 0,05% (SPS)	4000	3736	264	6,17 ^{bcd}
T9 - Glifosato 2% (controle positivo)	4000	3643	357	3,78 ^e

SM = Santa Maria; SPS = São Pedro do Sul

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste χ^2 em nível de 5% de significância.

Fonte: elaborada com base nos dados do experimento.

Em estudo realizado por Borges et al. (2011) utilizando sementes de cebola para avaliação dos efeitos citotóxicos e alelopáticos de extratos aquosos de *Ricinus communis*, os autores observaram um incremento na divisão celular nos tratamentos submetidos os extratos aquosos com as folhas secas de *R. communis* nas concentrações de 5 g.L⁻¹ e 10 g.L⁻¹.

O tratamento que recebeu óleo essencial da população coletada em SPS (T8) apresentou comportamento inverso, do qual observa-se que a divisão celular foi significativamente inferior ao controle negativo (T6 x T8, $\chi^2 = 3.332$). Isso indica efeito antiproliferativo do óleo na concentração utilizada.

Resultado semelhante foi encontrado por Stojanović-Radić et al. (2010) e Pinheiro (2016), os quais analisaram o efeito do óleo volátil de alecrim sobre células meristemáticas de *A. cepa*, constatando que o mesmo possui ação antiproliferativa sobre o organismo-teste. Fonseca et al. (2015) avaliando o potencial de óleos essenciais de plantas medicinais como *Baccharis dracunculifolia* DC. (vassourinha), *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeirinha) e *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini (arnica-brasileira), observaram maior eficácia do óleo essencial de vassourinha sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos.

Quanto ao efeito genotóxico do óleo essencial de *B. dracunculifolia* na concentração de 0,05%, verifica-se com base na tabela 4 que as duas populações diferiram significativamente do controle positivo com do glifosato 2%, que apresentou maior porcentagem de células com alterações em relação aos demais tratamentos. Pode-

se observar também que os tratamentos não diferiram estatisticamente do controle em água destilada.

TABELA 4 – Número de células meristemáticas de *Allium cepa* L. analisadas em interfase, em divisão, e o número de células com alterações para os tratamentos com óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. na concentração de 0,05%.

Tratamentos	Total de células analisadas	Células em divisão	Células com alterações (%)
T1 - Água destilada (controle negativo)	4000	278	2 ^{bcd}
T6 - Etanol (controle diluição óleo)	4000	306	6 ^b
T7 - Óleo 0,05% (SM)	4000	334	1 ^{bce}
T8 - Óleo 0,05% (SPS)	4000	264	5 ^{bc}
T9 - Glifosato 2% (controle positivo)	4000	151	25 ^a

SM = Santa Maria; SPS = São Pedro do Sul

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste χ^2 em nível de 5% de significância. Fonte: elaborada com base nos dados do experimento

Este resultado demonstra que o óleo essencial das duas populações estudadas não apresenta efeito genotóxico sobre as células de *A. cepa*. Apesar de algumas alterações terem sido encontradas nos tratamentos, estas foram relativamente inferiores do que as encontradas no controle positivo com glifosato, porém, em relação ao controle negativo em água, houve um aumento na porcentagem de alterações.

Em estudo realizado por Pinheiro (2016), o efeito do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* cultivados sobre diferentes períodos de salinidade, na concentração de 0,20% não apresentou efeito genotóxico sobre as células de *A. cepa*. Da mesma forma, Frescura (2014) pôde-se observar que poucas alterações cromossômicas foram encontradas a uma concentração de 3% do óleo essencial de *R. officinalis*.

As alterações cromossômicas observadas nos tratamentos, tanto nos extratos aquosos como no óleo essencial foram células irregulares, como por exemplo pontes cromossômicas em anáfase e telófase, e metáfases irregulares com cromossomos perdidos (Figura 4a, 4b, 4c e 4d).

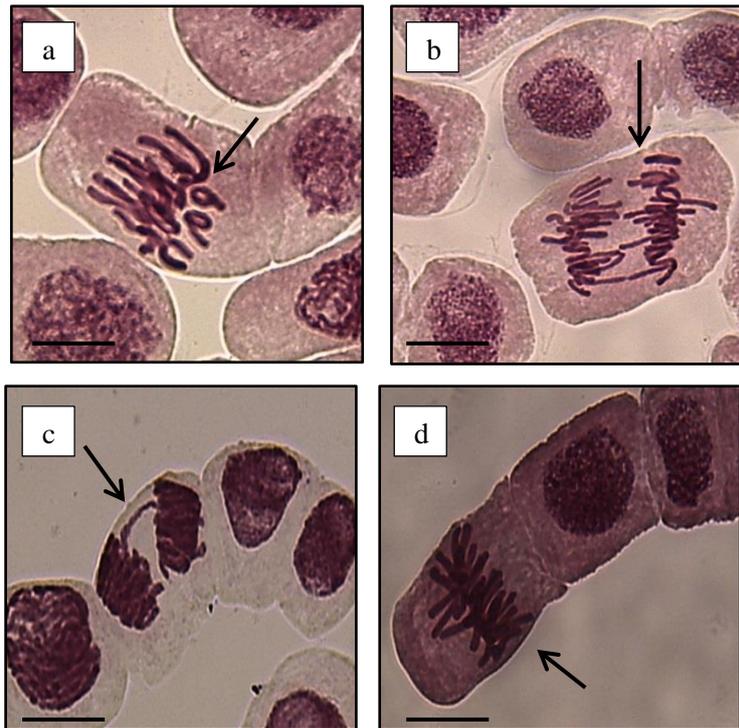


FIGURA 4 – A seta em **a** indica alteração cromossômica e a seta em **d** indica uma metáfase regular de células de *Allium cepa* submetidas ao tratamento com óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* da população São Pedro do Sul. A seta em **b** indica alteração cromossômica em células de *A. cepa* no tratamento com etanol 70%. A seta **c** indica alteração cromossômica nas células de *Allium cepa* submetidas ao tratamento de recuperação com extratos de *Baccharis dracunculifolia* na concentração de 5 g.L⁻¹. Escala = 10µm.

Hollenbach et al. (2014) avaliando o potencial genotóxico do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em ratos Wistar através do teste de micronúcleos sugerem que o óleo dessa planta não possui atividade genotóxica. O mesmo resultado foi observado por Grippa (2009) em estudo da genotoxicidade do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi por meio da análise em células de *Allium cepa*, onde não foi verificada atividade genotóxica do óleo. Já em células meristemáticas de *Lactuca sativa*, Powlowski et al. (2010) demonstraram acentuado efeito genotóxico do óleo essencial de *S. terebinthifolius*.

4.2 SISTEMA TESTE DE *Lactuca sativa* L.

Os resultados obtidos através da análise do ciclo celular das raízes de *Lactuca sativa* estão apresentados na Tabela 5.

TABELA 5 – Número de células de *Lactuca sativa* L. analisadas em interfase, em divisão, e os índices mitóticos (IM) dos controles e tratamentos com extratos aquosos das folhas de *Baccharis dracunculifolia* DC. bem como os tratamentos de recuperação.

Tratamento	Total de células analisadas	Células em interfase	Células em divisão	Índice mitótico (%)
T1 - Água destilada (controle negativo)	4000	3833	167	4,18 ^{ab}
T2 - Extrato aquoso 5g.L ⁻¹ (SM)	4000	3909	91	2,28 ^e
T3 - Extrato aquoso 10g.L ⁻¹ (SM)	4000	3814	186	4,65 ^a
T4 - Extrato aquoso 5g.L ⁻¹ (SPS)	4000	3858	142	3,55 ^{abcd}
T5 - Extrato aquoso 10g.L ⁻¹ (SPS)	4000	3862	138	3,45 ^{abc}
T6 - Glifosato 2% (controle positivo)	4000	3998	2	0,05 ^{fg}
T7 - Recuperação em água	4000	3997	3	0,08 ^f
T8 - Recuperação extrato aquoso 5g.L ⁻¹	4000	3999	1	0,03 ^{fgh}
T9 - Recuperação extrato aquoso 10g.L ⁻¹	4000	4000	0	0 ^{fghi}

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste χ^2 em nível de 5% de significância.
Fonte: elaborada com base nos dados do experimento.

Considerando os dados da tabela, constatou-se diferença significativa somente entre os tratamentos T2, T6, T7, T8 e T9 quando comparados ao controle negativo (T1), onde os valores de χ^2 para cada comparação foram: T1 x T2 = 23.134; T1 x T6 = 164.571; T1 x T7 = 161.647; T1 x T8 = 167.542 e T1 x T9 = 170.560). Nesse caso, é possível observar também a ocorrência da inibição da divisão celular das radículas de *L. sativa*. Dentre os tratamentos testados, apenas o T3 apresentou comportamento diferenciado em relação aos demais, verificando-se neste extrato, efeito proliferativo sobre as células de *L. sativa*.

Para a população Santa Maria (SM) os extratos aquosos nas duas concentrações (5 g.L⁻¹ e 10 g.L⁻¹) apresentaram comportamentos contrários, onde observa-se uma diminuição significativa da divisão celular no tratamento de menor concentração (T2, IM = 2,28) e um aumento do índice mitótico no tratamento de maior concentração (T3, IM = 4,65) quando comparados com o controle negativo (T1, IM= 4,18). Nesse caso, verifica-se diferença significativa entre os tratamentos, sendo o valor de χ^2 para essa combinação: T2 x T3 = 33.750.

Borges et al., (2011), estudando os extratos aquosos de *Ricinus communis* L. (mamona) com diferentes bioindicadores, observou aumento nos valores dos índices mitóticos no biensaio realizado com sementes de *Lactuca sativa*, nas concentrações de

5g.L⁻¹ e 10 g.L⁻¹ submetidas aos extratos das folhas secas de *R. communis* e uma diminuição do índice nas maiores concentrações (20 g.L⁻¹ e 40 g.L⁻¹).

Na população de São Pedro do Sul (SPS), os dois tratamentos com extratos aquosos reduziram os valores dos índices mitóticos quando comparados com a água, os quais, não diferem estatisticamente entre si (T4 x T5 = 0,059), conferindo assim capacidade antiproliferativa desses extratos sobre o ciclo celular de *L. sativa*.

Essa redução nos valores dos índices mitóticos em células meristemáticas de *L. sativa* também foi verificada por Sousa e Viccini (2010), em um estudo citotóxico e genotóxico dos extratos aquosos de *Achillea millefolium* L. nas concentrações de 5, 10, 20 e 30 mg.ml⁻¹. Da mesma forma, Souza et al., (2005b) verificou que com o aumento da concentração do extrato aquoso de espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss.) sobre as células meristemáticas de *L. sativa*, houve uma redução do índice mitótico.

O controle positivo diferiu significativamente tanto do controle negativo (T1) quanto dos tratamentos que receberam os extratos aquosos (T2, T3, T4 e T5), sendo os valores do χ^2 para as comparações: T1 x T9 = 170.560; T2 x T9 = 92.040; T3 x T9 = 190.427; T4 x T9 = 144.566 e T5 x T9 = 140.422.

Em relação ao potencial de recuperação celular sobre as sementes que primeiramente foram submetidas ao glifosato por 24 horas e posteriormente colocadas em água destiladas e nos extratos aquosos de *B. dracunculifolia*, os pós-tratamentos (T7, T8 e T9) não diferiram significativamente do controle positivo (T6). Ou seja, os pós-tratamentos não alcançaram uma recuperação da atividade antimitótica promovida pelo glifosato, continuando prejudicadas a germinação e a proliferação celular de *L. sativa*.

Segundo Carvalho et al. (1996), é de extrema importância o desenvolvimento de estudos que avaliem o potencial alelopático de substâncias produzidas pelas plantas, bem como, a identificação das mesmas, no que diz respeito a utilização de extratos capazes de inibir a disseminação de plantas daninhas visando reduzir o uso de herbicidas comerciais.

4.3 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

4.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A análise fitoquímica dos extratos aquosos de *B. dracunculifolia* identificou a presença dos seguintes compostos: ácido gálico (tR = 10.13 min; pico 1), catequina (tR = 19.88 min; pico 2), ácido clorogênico (tR = 25.79 min; pico 3), ácido p-cumárico (tR = 30.26 min; pico 4), rutina (tR = 33.91 min; pico 5), quercetina (tR = 41.18 min; pico 6) e luteolina (tR = 50.43 min; pico 7). A Figuras 5 mostra o perfil cromatográfico dos extratos analisados.

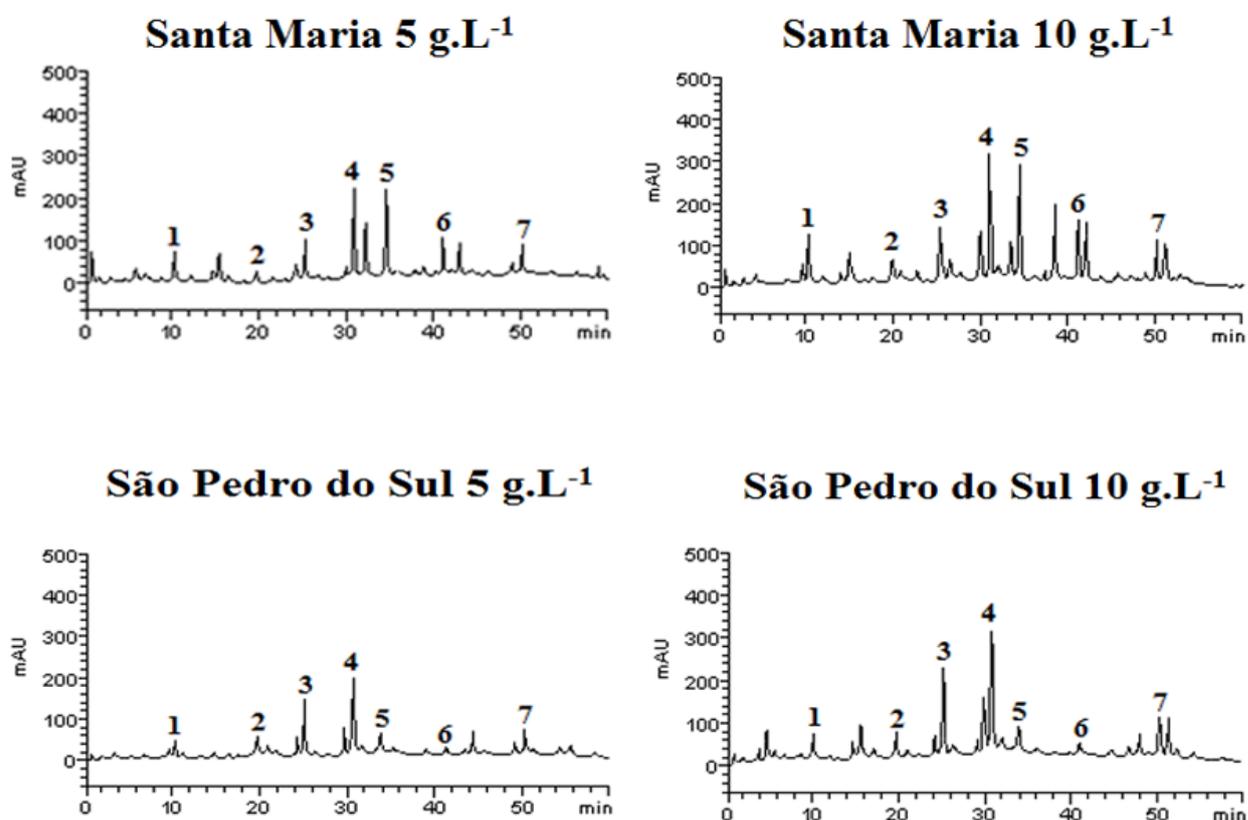


FIGURA 5 – Perfil representativo da Cromatografia Líquida de Alta Eficicência dos extratos aquosos das folhas de *Baccharis dracunculifolia*. Ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido clorogênico (pico 3), ácido p- cumárico (pico 4), rutina (pico 5), quercetina (pico 6) e luteolina (pico 7).

A Tabela 6 confirma os dados verificados no perfil e mostra a quantidade média de cada um dos compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos de *B. dracunculifolia* analisados.

É possível verificar que o ácido *p*-cumárico foi o elemento majoritário no extrato aquoso de *B. dracunculifolia* da população SM, não diferindo da rotina, elemento com a segunda maior quantidade. Na população SPS, o elemento majoritário é igualmente o ácido *p*-cumárico, seguido do ácido clorogênico. O ácido *p*-cumárico, composto fenólico predominante nos extratos aquosos das duas populações de *B. dracunculifolia*, possui como característica a atividade alelopática sobre a germinação e o desenvolvimento da radícula de espécies daninhas de pastagens cultivadas, sendo estes efeitos inibitórios promovidos pelo ácido *p*-cumárico positivamente relacionados à concentração (SOUZA FILHO et al., 2005).

A promoção dos efeitos, estimulante ou inibitório, sobre o ciclo celular pode ser influenciado pela alta concentração de compostos químicos nos extratos das plantas (FACCHINETO et al., 2007). O comportamento das células meristemáticas frente aos extratos observado nesse estudo pode estar relacionado com os compostos fenólicos encontrados, uma vez que, com o aumento da concentração do extrato, ocorreu um aumento na concentração dos compostos fenólicos, e conseqüentemente, um aumento no número de células em divisão celular.

É possível que, esse aumento na proliferação celular seja reflexo de fatores ambientais, uma vez que a taxa de produção de metabólitos secundários pode ser coordenada ou alterada por diversos fatores ambientais, dentre eles a sazonalidade, estádios de desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica e de nutrientes, poluição atmosférica, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos.

Em estudo realizado por Rezende et al. (2014) o extrato hidroalcoólico das folhas de *B. dracunculifolia* demonstrou ter relevantes propriedades hepatoprotetivas *in vivo*, apoiando a sua utilização tradicional.

Frescura (2014), estudando a espécie *Rosmarinus officinalis* (Alecrim), verificou o efeito antiproliferativo dos extratos aquosos da espécie, atribuindo esse comportamento a sua composição fitoquímica, na qual o composto majoritário dos extratos foi o ácido rosmarínico. Ainda, Frescura et al. (2012), avaliando o efeito de *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Britton e *Psychotria birotula* Smith & Downs sobre a germinação e o ciclo celular de sementes de *Eruca sativa*, também foi verificado

potencial antiproliferativo (alelopático) dessas espécies sobre a germinação de sementes e sobre o ciclo celular.

TABELA 6 – Compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos das folhas de *Baccharis dracunculifolia* DC. de duas populações, Santa Maria (SM) e São Pedro do Sul (SPS), em duas diferentes concentrações, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência.

Compostos	SM	SM	SPS	SPS	LOD	LOQ
	5 g.L ⁻¹	10 g.L ⁻¹	5 g.L ⁻¹	10 g.L ⁻¹		
	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	µg/mL	µg/mL
Ácido gálico	1.13 ^c	2.15 ^c	0.78 ^c	0.89 ^d	0.019	0.063
Catequina	0.37 ^d	0.83 ^e	0.83 ^c	0.95 ^d	0.008	0.026
Ácido clorogênico	1.25 ^b	2.19 ^c	2.46 ^b	4.07 ^b	0.025	0.082
Ácido <i>p</i> -cumárico	4.03 ^a	4.56 ^a	3.52 ^a	4.83 ^a	0.011	0.036
Rutina	3.97 ^a	4.37 ^b	0.87 ^c	0.96 ^d	0.023	0.075
Quercetina	1.19 ^b	2.16 ^c	0.29 ^d	0.31 ^e	0.027	0.089
Luteolina	1.10 ^c	1.25 ^d	0.91 ^c	1.23 ^c	0.012	0.037
TOTAL	13.04	17.51	9,66	13,24		

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey em nível de 5% de significância.
Fonte: elaborada com base nos dados do experimento.

3.3.2 Cromatografia gasosa (CG)

A análise cromatográfica do óleo essencial extraído das folhas de *B. dracunculifolia*, na concentração de 0,05%, detectou a presença de 23 substâncias, (Tabela 5), sendo estas as identificadas: α -Tujeno, α -Pineno, Canfeno, β -Pineno, β -Mirceno, α -Terpineno, *p*-Cimeno, Limoneno, (E)- β -ocimeno, *d*-Terpineno, Linalol, α -Terpineol, Metil eugenol, Cariofileno, *d*-Elemeno, Aromadendreno, α -Muuroleno, Germacreno D, α -Cadideno, E-Nerolidol, Espatuleno, Óxido de cariofileno, Cubenol.

Os elementos majoritários presentes no óleo essencial das folhas das duas populações de *B. dracunculifolia* foram E-nerolidol (36,71% – SPS e 32,98% - SM) e espatuleno (10,65% - SPS e 11,36% - SM).

TABELA 7 - Compostos fenólicos presentes no óleo essencial das folhas de *Baccharis dracunculifolia* de duas populações, Santa Maria (SM) e São Pedro do Sul (SPS), na concentração de 0,05%, obtidos por cromatografia gasosa.

Compostos	RI ^a	RI ^b	São Pedro do Sul - SPS (%)	Santa Maria - SM (%)
α -Tujeno	927	931	0.08	0.21
α -Pino	937	939	2.73	2.87
Canfeno	951	953	0.15	0.11
β -Pino	980	980	6.19	3.95
β -Mirceno	997	991	0.35	1.24
α -Terpineno	1017	1016	-	0.07
p-Cimeno	1023	1026	0.09	-
Limoneno	1032	1031	6.13	4.97
(E)- β -ocimeno	1149	1050	0.27	0.16
d-Terpineno	1062	1062	-	0.53
Linalol	1097	1098	0.15	-
α -Terpineol	1190	1189	0.45	1.09
Metil eugenol	1398	1401	0.04	-
Cariofileno	1419	1418	1.95	2.37
d-Elemeno	1438	1433	0.79	0.65
Aromadendreno	1445	1439	0.24	0.61
α -Muurolo	1501	1499	4.86	5.37
Germacreno D	1483	1480	1.45	2.38
α -Cadideno	1536	1538	3.15	1.86
E-Nerolidol	1563	1564	36.71	32.98
Espatuleno	1576	1576	10.65	11.36
Óxido de cariofileno	1580	1581	3.25	3.64
Cubenol	1645	1642	1.97	2.05
Total (%)			81.65	78.47

As proporções relativas de óleo essencial estão expressas em porcentagem. ^aÍndice de Retenção experimental (baseado em séries homólogas de *n*-alcano C₇-C₃₀). ^bÍndice de Retenção da literatura (Adams, 1995).

O comportamento das células meristemáticas de *A. cepa* submetidas aos tratamentos com óleo essencial foi inverso entre as duas populações estudadas. Enquanto que para a população de Santa Maria ocorreu um aumento do índice mitótico, na população de São Pedro do Sul, houve uma diminuição. Este resultado pode estar relacionado a concentração dos compostos encontrados no óleo essencial. Estudos biológicos anteriores mostraram que (E)-nerolidol possui atividade protetora gástrica, ou seja, exibe uma inibição significativa da formação de úlceras induzidas por agentes físicos e químicos (KLOPELL et al., 2007).

A composição química dos óleos essenciais da espécie *B. dracunculifolia* é muito variada. Boix et al. (2010) encontraram os compostos verbenona (10,1%), mirceno (10,2%), 1,8-cineol (10,4%) e a cânfora (25,2%) como constituintes principais do óleo essencial de *B. dracunculifolia*. Por outro lado, Schossler et al. (2009) encontraram os compostos E-nerolidol (22,80%) mais o β -Pino (12,17%) como constituintes majoritários. Já Parreira et al. (2010) encontraram o (E)-nerolidol (33,51%) e o espatulenol (16,24%) como constituintes predominantes, similarmente Santos et al. (2012) identificaram os sesquiterpenos E-nerolidol (33,81%) e espatulenol (18,96%).

Galvão et al. (2012) avaliando a atividade antimicrobiana e o efeito antiproliferativo do óleo essencial de 20 plantas medicinais, dentre elas, o foco de estudo do presente trabalho, verificaram a eficácia biológica do óleo essencial das folhas de *B. dracunculifolia* sobre *Streptococcus mutans*, sendo que a análise cromatográfica realizada pelos autores também revelou a presença de E-nerolidol e espatulenol em quantidades semelhantes as apresentadas na tabela 5, corroborando com os resultados aqui encontrados.

Atividades como a inibição da germinação e crescimento radicular, sobre diferentes espécies vegetais, são resultado da presença de sesquiterpenos, como E-nerolidol e espatulenol, o que pode viabilizar o desenvolvimento de produtos para o controle de plantas invasoras (SANTOS et al., 2012). Para comprovação dos efeitos desses compostos, seriam necessários mais estudos relacionados a atuação de cada composto em particular sobre os organismos-teste.

5 CONCLUSÕES

Baccharis dracunculifolia apresentam potencial antiproliferativo pelo teste de *Allium cepa* na forma de extrato aquoso.

Os extratos possuem ação antimitótica e antigenotóxica sobre o sistema teste de *A. cepa*.

Os efeitos dos extratos aquosos pelo teste de *Lactuca sativa* também demonstraram potencial antiproliferativo, nas duas concentrações para a população São Pedro do Sul e na concentração 5 g.L⁻¹ para população Santa Maria.

Pelo sistema teste de *A. cepa* o óleo essencial não apresenta efeito genotóxico, da mesma forma que o extrato aquoso, exceto aquele da população SM (10 g.L⁻¹).

Os compostos fenólicos encontrados nos extratos aquosos são: ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico, rutina, quercetina e luteolina, tendo o ácido *p*-cumárico como elemento majoritário nas duas populações.

Os principais compostos presentes no óleo essencial são: E-nerolidol, espatulenol, β -Pineno, limoneno e α -Muuroleno, sendo o E-nerolidol o elemento predominante no óleo das duas populações estudadas.

REFERÊNCIAS

ABREU, P. A. P.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana dos extratos de *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae). **Sabios - Revista Saúde e Biologia**, v. 5, n. 2, p.1-6, jul./dez., 2010.

AGOSTINI, F. et al. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 215-220, jul/set. 2005.

ALAERTS, G. et al. Chromatographic fingerprint development for herbal extracts: a screening and optimization methodology on monolithic columns. **Journal of chromatographi A**, v. 1172, n. 1, p. 1-8, 2007.

ALVES, A. R.; SILVA, M. J. P. O uso de fitoterapia no cuidado de crianças com até 5 anos em área central e periférica da cidade de São Paulo. **Revista Escola de Enfermagem**, USP, v. 37, n. 4, p. 85-91, 2003.

AYRES, M. **BioEstat 5.3**: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. 5. Ed. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília CNPq. 2007.

BELINELO, V. J. et al. Alelopatia de *Arctium minus* Bernh (Asteraceae) na germinação e crescimento radicular de sorgo e pepino. **Revista Caatinga**, v. 21, p. 12-16, 2008.

BEZERRA, F. P. C. A. et al. Alelopatia de *Carapa guianensis* na germinação e no comprimento de *Lactuca sativa*. In: IX Simpósio Nacional do Cerrado e II Simpósio Internacional Savanas Tropicais. Brasília, DF, 2008.

BOIX, Y. F. et al. Volatile compounds from *Rosmarinus officinalis* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC. Growing in southeast coast of Brazil. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 255-7, 2010.

BOLHMANN, F. et al. Five diterpenes and other constituents from nine *Baccharis* species. **Phytochemistry**, v. 20, p. 281-286, 1981.

BORGES, C. S. Efeitos citotóxico e alelopático de extratos aquosos de *Ricinus communis* utilizando diferentes bioindicadores. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 5, n. 3, p. 15-20, 2011.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; SANTOS, C. A. M.; FARAGO, P. V. Morfoanatomia foliar e caulinar de *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 477-483, 2004.

CABRERA, G.L.; RODRIGUEZ, D.M.G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant biossays. **Mutation Research**, v. 426, p. 211-214, 1999.

CANCELLI, R. R.; EVALDT, A. C. P.; BAUERMANN, S. G. Contribuição a morfologia polínica da família Asteraceae Martinov. no Rio Grande do Sul – Parte I. **Pesquisa Botânica**, n. 58, p. 347-374, 2007.

CANTON, M.; ONOFRE, S. B. Interferência de extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 348-354, 2010.

COSTA, A. G. L. C. **Estudo químico de *Baccharis dracunculifolia* DC. e sua correlação com a própolis verde de uma microrregião de campos gerais do Paraná.** 2009. 74 p. Dissertação (Mestrado - Área de concentração em química) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2009.

CARVALHO, G. J. et al. Potencialidades alelopáticas de folhas verdes + ponteiro de cana-de-açúcar em diferentes concentrações de matéria seca, na germinação de sementes de alface. **Ciências**, v. 5, n. 2, p. 19-24, 1996

DALLA NORA, G. et al. Antiproliferative and genotoxic effects of *Mikania glomerata* (Asteraceae). **Biocell**, v. 34, p. 95-101, 2010.

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

FACHINETTO, J. M.; TEDESCO, S. B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata*

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

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**, v. 17, n. 1, p. 49-54, jan./mar. 2007.

FERRONATTO, R. et al. Atividade antioxidante de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* DC. e *Baccharis uncinella* DC. (Asteraceae). **Arquivo da Ciência da Saúde da Unipar**, Umuarama, v. 10, n. 2, mai./ago. 2006.

FERRONATTO, R. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* DC. e *Baccharis uncinella* DC. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 224-230, abr./jun. 2007.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, Reino Unido, v. 102, n. 1, p. 99-112, mar. 1985.

FRANCO, I. J.; FONTANA, V. L. **Ervas & plantas: a medicina dos simples**. 12.ed. Erechim: Edelbra, 2011. 208p.

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

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** [online], v. 37, n. 2, p. 23-28, 2013.

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

FONSECA, M. C. M. et al. Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 24-50, 2015.

FUKUDA, M. et al. Studies on the Constituents of the Leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their Cytotoxic Activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 54, p. 1465-1468, 2006.

GALVÃO, L. C. C. et al. Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Streptococcus mutans* and their Antiproliferative Effects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 12 p., 2012.

GIOTTO, A. C.; OLIVEIRA, S. C. C.; SILVA, J. G. P. Efeito alelopático de *Eugenia dysenterica* Mart. ex DC. Berg. (Myrtaceae) na Germinação e no Crescimento de

Lactuca sativa L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 600-602, jul. 2007.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-81, 2007.

GOMES, V.; FERNANDES, G. W. Germinação de aquênios de *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Revista Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 4, p. 421-427, 2002.

GRIPPA, G. A. **Avaliação genotóxica e mutagênica do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* e estudo de sua ação antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro e in vivo.** 2009, 102f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2009.

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

HENDRINKS, M. M. W. B. et al. Preprocessing and exploratory analysis of chromatographic profiles of plant extracts. **Analytica Chimica Acta**, [S.l.], v. 545, n. 1, p. 53-64, 2005.

HOLLENBACH, C. B. et al. Avaliação do potencial genotóxico do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em ratos Wistar por meio do teste de micronúcleos. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 12, n. 2, p. 66-71, 2014.

JULIÃO, G. R. et al. Insetos galhadores associados a duas de plantas invasoras de áreas urbanas e peri-urbanas. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 49, p. 97-106, 2005.

KLOPELL, F. C. et al. Nerolidol, an Antiulcer Constituent from the Essential Oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Zeitschrift fur Naturforsch C**, v. 62, p. 537-542. 2007.

KUHN, A. W. et al. Mutagenic and antimutagenic effects of *Eugenia uniflora* L. by the *Allium cepa* L. test. **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**. <http://dx.doi.org/10.1080/00087114.2014.998525>

LAGO, J. H. G.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A. Composição química dos óleos essenciais das folhas de seis espécies do gênero *Baccharis* de “campos de altitude” da mata atlântica paulista. **Química nova**, v. 31, n. 4, p. 727-730, 2008.

LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, p. 471-486, 1938.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F. J. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MATSUMOTO, S. T. et al. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish

Oreochromis niloticus and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 148-158, 2006.

MONDIN, C. A. Riqueza genérica e dados biogeográficos das asteráceas brasileiras. Os avanços da Botânica no início do século XXI: morfologia, fisiologia, taxonomia, ecologia e genética. In: Conferências Plenárias e Simpósios do 57º Congresso Nacional de Botânica. 1. ed. 2006, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre: Pallotti, 2006.

MORI, S. A. et al. **Manual de manejo do herbário fanerogâmico**. Ilhéus: CEPLAC, 104 p., 1989.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal plants of Brazil**. Michigan: Reference Publications, 372p. 2000.

NASCIMENTO, E. A. et al. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 379-386, jul./set. 2008.

NEVES, E. S. B. et al. Action of Aqueous Extracts of *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) leaves on Meristematic Root Cells of *Allium cepa* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1131-1136, 2014.

NWANNA, E.E. et al. In vitro neuroprotective properties of some commonly consumed green leafy vegetables in Southern Nigeria. **NFS Journal**, v. 2, p. 19-24, 2016.

OLGUIN C. A. F. et al. Avaliação do potencial biológico alelopático dos extratos fracionados da raiz da *Vernonia tweediana* Baker. **Revista Varia Scientia**, v. 5, n. 10, p.137-143, 2005.

PAIVA, S. R. de; FOUTOURA, L de A.; FIGUEIREDO, M. R. Perfil cromatográfico de duas espécies de Plumbaginaceae: *Plumbago scandens* L. e *Plumbago auriculata* LAM. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 717-721, 2002.

PARREIRA, N.A. et al. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, p. 993-1001, 2010.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2502-2506, 2002.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1100-1103, 2004.

PASQUALI, M.; TEDESCO, M.; TEDESCO, S. B. Potencial antiproliferativo e genotóxico de *Allophylus edulis* (A.St.-Hil., Cambess. & A. Juss.) Radlk. pelo teste de *Allium cepa* L. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 11, n. 21, p. 2365-2372, 2015.

PAWLOWSKI, A. et al. Efeito citotóxico e genotóxico do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) sobre o meristema radicial de alface. In: Resumos do 56º Congresso Brasileiro de Genética, São Paulo, 2010.

PINHEIRO, S. M. G. **Crescimento, composição fitoquímica e efeito genotóxico do óleo essencial em Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sob diferentes períodos de salinidade.** 2016. 50 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

PIRIZ, M. A. et al. Uso de plantas medicinais: impactos e perspectivas no cuidado de enfermagem em uma comunidade rural. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 15, n. 4, p. 992-999, 2013.

REZENDE, T. P. et al. Protective effects of *Baccharis dracunculifolia* leaves extract against carbon tetrachloride- and acetaminophen-induced hepatotoxicity in experimental animals. **Molecules**, v. 19, p. 9257-9272, 2014.

SANTOS, R. F. et al. Composição química e produtividade dos principais componentes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. em função da adubação orgânica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 224-234, 2012.

SCHEFFER, M. C.; MING, L. C.; ARAÚJO, A. J. Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais. In: Queiróz, M.A. de; Goedert, C.O.; Ramos, S.R.R. (Eds.). Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste brasileiro. (on line). Petrolina, Embrapa Semi Árido/Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1999. Disponível em: <<http://www.cpatia.embrapa.br>>. Acesso em: 07 de out de 2014.

SCHOSSLER, P. et al. Volatile compounds of *Baccharis punctulata*, *Baccharis dracunculifolia* and *Eupatorium laevigatum* obtained using solid phase microextraction and hydrodistillation. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 2, p. 277-87, 2009.

SFORCIN, J. M. et al. *Baccharis dracunculifolia*: uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira. São Paulo: Editora Unesp, 2012.

SIMÕES, C. M. O. S. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 1102 p., 2004

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre/ Florianópolis: Editora UFRGS/ UFSC, p. 387-416, 1999.

SPRING, O. Chemotaxonomy Based on Metabolites from Glandular Trichomes. **Advances in Botanical Research**, v. 31, p. 153-174, 2000.

SOUSA, S. M.; VICCINI, L. F. Citotoxic and genotoxic activity of *Achillea millefolium* aqueous extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 1, p. 98-104, 2011.

SOUZA, S. A. M. **Biotestes na Avaliação da Fitotoxicidade de Extratos Aquosos de Plantas Medicinais Nativas do Rio Grande do Sul**. 2005. 89 f. Monografia (Curso de Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.

SOUZA, S. A. M. et al. Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação do efeito citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 5, n. 1, 2005a.

SOUZA, S. A. M. et al. Atividade alelopática e citotóxica do extrato aquoso de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* mart. ex reiss.). **Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v. 11, p. 7-14, set./dez., 2005b.

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, p. 871-877, 2010.

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.

SOUZA FILHO, A. P. S.; PEREIRA, A. A. G.; BAYMA, J. C. Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 25-32, 2005.

TEDESCO, M. **Caracterização citogenética, compostos fenólicos e genotoxicidade de *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. (Adoxaceae)**. 2015. 75 p. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

TEDESCO, S. B.; LAUGHINGHOUSE, H. D. Bioindicador of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. **Environmental Contamination**, Ed. Srivastava J., 2012. Disponível em: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/29315.pdf>.

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

TEIXEIRA, E. W. et al. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 85-92, 2005.

TRAPP, K. C. et al. Efeitos genotóxicos e antiproliferativos de *Prunus myrtifolia* (Pessegueiro-do-mato) pelo teste de *Allium cepa*. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 11, n. 21, p. 2222-2230, 2015.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

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

VIEGAS, M. C.; BASSOLI, D. G. Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-INNOWAX. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 2031-2034, 2007.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. **Óleo essencial de Eucalipto**. Documentos Florestais, n. 17, USP, São Paulo, 2003