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

Micheli Bortoluzzi Baldoni

# GENOTOXICIDADE, ATIVIDADE PROLIFERATIVA E ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS AQUOSOS E DO ÓLEO DE *Origanum majorana* L.

**Santa Maria, RS, Brasil**
**2017**

**Micheli Bortoluzzi Baldoni**

# GENOTOXICIDADE, ATIVIDADE PROLIFERATIVA E ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS AQUOSOS E DO ÓLEO DE *Origanum majorana* L.

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.**

Solange Bosio Tedesco

Santa Maria, RS, Brasil
2017

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

Bortoluzzi Baldoni, Micheli
Genotoxicidade, atividade proliferativa e análise fitoquímica dos extratos aquosos e do óleo de Origanum majorana L. / Micheli Bortoluzzi Baldoni.- 2017.
48 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, 2017

1. Genotoxicidade 2. Capacidade proliferativa 3. Teste Alluim cepa 4. Origanum majorana 5. Manjerona I. Bosio Tedesco, Solange II. Título.

**Micheli Bortoluzzi Baldoni**

# GENOTOXICIDADE, ATIVIDADE PROLIFERATIVA E ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS AQUOSOS E DO ÓLEO DE *Origanum majorana* L.

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 3 de março de 2017:**

_____

**Solange Bosio Tedesco, Dra (UFSM)**
(Presidente/|Orientador)

_____

**Viviane Dal-Souto Frescura, Dra (UFSM)**

_____

**Thais Scotti Canto-Dorow, Dra (UNIFRA)**

Santa Maria, RS
2017

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre ao meu lado me dando forças para seguir em frente e vencer as batalhas cotidianas.

Aos meus pais Carlos Francisco e Izelda, por todo amor, carinho e apoio nos momentos de dúvida e insegurança, sem os quais não chegaria até aqui.

Aos meus irmãos pelo incentivo e apoio, em especial ao meu irmão Felipe pelo amor incondicional dedicado a mim.

Ao meu companheiro, Cleber por todo o amor, amizade, paciência e companheirismo durante minha trajetória, me apoiando nos momentos difíceis.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Solange Bosio Tedesco pela orientação, amizade, conselhos e direcionamento para que este sonho fosse possível.

Aos meus amados amigos Marina e Roberto que foram fundamentais na minha vida, colaborando muito para que eu realizasse esse sonho e abriram mão do seu tempo para se dedicar a me ajudar.

Às amigas, Cassiane, Kássia, Luísa e Valéria que tornaram meus dias no lab maravilhosos com muitas risadas, histórias e conselhos.

Às colegas do LABCITOGEN Andrielle, Carmine, Jéssica, pelas conversas e companhia durante esse processo.

Ao professor Jerônimo pelo espaço cedido para realização do experimento.

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

À Prof. Marli Matiko Anraku de Campos e Aline Boligon pela ajuda com as análises cromatográficas.

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

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

A TODOS VOCÊS, MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS.

*Dedico aos meus pais, que foram os meus primeiros mestres. A eles dedico esta conquista, pois deixaram seus sonhos de lado para realizar o meu.*

# RESUMO

## GENOTOXICIDADE, ATIVIDADE PROLIFERATIVA E ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS AQUOSOS E DO ÓLEO DE Origanum majorana L.

AUTORA: Micheli Bortoluzzi Baldoni
ORIENTADORA: Solange Bosio Tedesco

As plantas medicinais são culturalmente utilizadas pela população brasileira na cura e no tratamento de doenças e essa prática é favorecida pelo fato do Brasil ser rico em biodiversidade favorece esta prática. Entre as plantas medicinais usadas tem-se a manjerona (*Origanum majorana* L.) pertencente à família Lamiaceae. Esta espécie é comumente utilizada como aromática, analgésica, antioxidante, antisséptica, digestiva, expectorante e na culinária. Assim, o presente trabalho teve como objetivos analisar a genotoxicidade e a atividade proliferativa dos extratos aquosos e do óleo das folhas de manjerona sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L., além de verificar a composição fitoquímica através de cromatografia. Os extratos aquosos foram preparados a partir das folhas de manjerona que foram cultivadas em ambientes distintos (campo e estufa) e com dois métodos de secagem (natural à sombra e em forno micro-ondas). Para extração do óleo essencial foram utilizadas folhas frescas. A avaliação da genotoxicidade e atividade proliferativa através do teste de *Allium cepa* foram conduzidas em laboratório através do delineamento inteiramente casualizado com 13 grupos de bulbos em 5 repetições. Os tratamentos foram constituídos de água destilada, glifosato 2%, infusão das folhas de manjerona com concentrações de 6 e 12 g $L^{-1}$, óleo essencial diluído a 0,075% e álcool etílico. Esses tratamentos foram divididos tendo como base dois métodos de secagem de folhas: em temperatura ambiente (natural) à sombra e em forno micro-ondas, a fim da comparação da composição fitoquímica dos extratos aquosos. Para a análise genotóxica e da capacidade proliferativa foram preparadas lâminas pela técnica de esmagamento da região meristemática da raiz e coloração com orceína acética 2%, possibilitando a observação das diferentes fases da divisão mitótica durante o ciclo celular. Os resultados obtidos através do teste de *Allium cepa* demonstram que os tratamentos com as infusões e óleos de manjerona possuem efeito antiproliferativo e genotóxico. O óleo de manjerona 0,075% possui atividade antiproliferativa e potencial genotóxico. As análises cromatográficas indicaram que o componente majoritário dos óleos essenciais de manjerona em ambos os ambientes de cultivo foi Terpineno-4-ol, sendo que a concentração deste componente foi maior no cultivo em estufa, e nos extratos aquosos o componente majoritário foi o ácido clorogênico, com redução deste componente na produção em campo. A interação de tratamento dentro de cada ambiente de cultivo com relação ao índice mitótico mostra diferença entre as concentrações no cultivo em campo e não entre as concentrações no cultivo em estufa. A interação de tratamento dentro de cada método de secagem referente o índice mitótico nas concentrações de 6 $g.L^{-1}$ e 12 $g.L^{-1}$ não apresenta diferenças.



**Palavras-chave**: Manjerona. Cultivo em campo. Cultivo em estufa. Plantas medicinais

## ABSTRACT

**GENOTOXICITY, PROLIFERATIVE ACTIVITY AND PHYCHOCHEMICAL ANALYSIS OF AQUEOUS EXTRACTS AND OIL OF Origanum majorana L.**

AUTHOR: Micheli Bortoluzzi Baldoni
ADVISER: Solange Bosio Tedesco

Medicinal plants are culturally used by the Brazilian population in curing and treating diseases and the fact that Brazil is rich in biodiversity favors this practice. Among the medicinal plants used are the marjoram (*Origanum majorana* L.) belonging to the family Lamiaceae. This species is commonly used as aromatic, analgesic, antioxidant, antiseptic, digestive, expectorant and in cooking. The objective of the present work was to analyze the genotoxicity and proliferative activity of the aqueous extracts and the oil of the leaves of marjoram on the cell cycle of *Allium cepa*, besides to verify the phytochemical composition through Chromatography. The aqueous extracts were prepared from the marjoram leaves that were grown in different environments (field and greenhouse) and with two drying methods (natural shade and microwave oven). Fresh leaves were used to extract essential oil. The evaluation of genotoxicity and proliferative activity through the *Allium cepa* test were conducted in the laboratory through a completely randomized design with 13 groups of bulbs with 5 replicates. The treatments were composed of distilled water, glyphosate 2%, infusion of marjoram leaves with concentrations of 6 and 12 g $L^{-1}$, essential oil diluted to 0.075% and ethyl alcohol. These treatments were divided in two methods of drying the leaves: at room temperature (natural) and in microwave oven, in order to compare the phytochemical composition of the aqueous extracts. For the genotoxic analysis and the proliferative capacity, slides were prepared by the technique of crushing the meristematic region and staining with acetic orcein 2%, allowing the observation of the different phases of the mitotic division during the cell cycle. The results obtained by the *Allium cepa* test demonstrate that treatments with marjoram infusions and oils have an antiproliferative and genotoxic effect. 0.075% marjoram oil has antiproliferative activity and genotoxic potential. Chromatographic analysis indicated that the major component of the essential oils of marjoram in both culture environments was Terpinene-4-ol, and the concentration of this component was higher in greenhouse cultivation, and in the aqueous extracts the major component was chlorogenic acid. When it were produced in the field there was the reduction of this component. The treatment interaction within each culture environment in relation to the mitotic index shows a difference between the concentrations in the field crop and not between the concentrations in the greenhouse cultivation. The treatment interaction within each drying method for the mitotic index at concentrations of 6 $g.L^{-1}$ and 12 $g.L^{-1}$ showed no differences.



**Key words**: Marjoram. Field cultivation. Greenhouse cultivation. Medicinal plants.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Plantas de *Origanum majorana* L. ..... 15
Figura 2 – Plantas de *Origanum majorana* L. cultivadas em canteiros no município de Formigueiro/RS. ..... 21
Figura 3 – Plantas de *Origanum majorana* L. cultivadas na estufa Departamento de Fitotecnia, UFSM. ..... 22
Figura 4 – Material vegetal seco em micro-ondas. (A) Massa fresca. (B) Massa seca. ..... 22
Figura 5 – Material vegetal seco em temperatura ambiente (natural) à sombra. (A) Massa fresca. (B) Massa seca ..... 23
Figura 6 – Extratos aquosos preparados a partir da infusão de *Origanum majorana* L. ..... 23
Figura 7 – Bulbos de *Allium cepa* submetidos aos tratamentos com os controles (negativo e positivo), extratos aquosos e óleos de *Origanum majorana* L. ..... 25
Figura 8 – Células meristemáticas de *Allium cepa* L. com alterações cromossômicas. ..... 34

## 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 *Origanum majorana* L. ..... 30
Tabela 2 – Número de células meristemáticas de *Allium cepa* L. analisadas em interfase, em divisão e os índices mitóticos (IM) dos controles e tratamentos com óleos a 0,075% das folhas de *Origanum majorana* L. ..... 32
Tabela 3 – Número de células meristemáticas de *Allium cepa* L. analisadas em interfase, em divisão e as alterações cromossômicas dos controles e tratamentos com extratos aquosos das folhas de *Origanum majorana* L. ..... 33
Tabela 4 – Número de células meristemáticas de *Allium cepa* L. analisadas em interfase, em divisão e as alterações cromossômicas dos controles e óleos de *Origanum majorana* L. ..... 35
Tabela 5 – Compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos das folhas de *Origanum majorana* L. cultivadas em campo e estufa, secagem em micro-ondas e natural e em duas concentrações, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência. ..... 37
Tabela 6 – Composição do óleo essencial das folhas de *Origanum majorana* L. a cultivadas em campo e estufa, na concentração de 0,075% obtida por cromatografia gasosa. ..... 38
Tabela 7 – Valores médios para o ambiente de cultivo, método de secagem e tratamento referente ao índice mitótico dos extratos aquosos de *Origanum majorana* L. ..... 40
Tabela 8 – Desdobramento da interação de tratamento dentro de cada ambiente de cultivo referente ao índice mitótico dos extratos aquosos de *Origanum majorana* L. ..... 40
Tabela 9 – Desdobramento da interação de tratamento dentro de cada método de secagem referente ao índice mitótico. ..... 41

**SUMÁRIO**

**1 INTRODUÇÃO ..... 12**
**2 REVISÃO DE LITERATURA ..... 14**
2.1 FAMÍLIA LAMIACEAE E GÊNERO *ORIGANUM* ..... 14
2.2 O*riganum majorana* E SUA IMPORTÂNCIA MEDICINAL ..... 14
2.3 ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum majorana* ..... 16
2.4 ESTUDO GENOTÓXICO UTILIZANDO O TESTE *Allium cepa* ..... 16
2.5 MÉTODOS DE SECAGEM DE PLANTAS MEDICINAIS: NATURAL E EM FORNO MICRO-ONDAS ..... 17
2.6 SISTEMAS DE CULTIVO DE PLANTAS MEDICINAIS ..... 19
2.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) E CROMATOGRAFIA GASOSA (CG) ..... 19
**3 MATERIAL E MÉTODOS ..... 20**
3.1 CULTIVO DAS PLANTAS DE *Origanum majorana* ..... 20
3.2 COLHEITA E PREPARO DAS AMOSTRAS ..... 21
3.3 PREPARO DOS EXTRATOS AQUOSOS ..... 23
3.4 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL ..... 24
3.5 ANÁLISE DA GENOTOXICIDADE E DA PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO TESTE *IN VIVO* DE *Allium cepa* ..... 24
3.6.1 Produtos químicos, aparelhos e procedimentos gerais ..... 26
3.6.2 Quantificação dos compostos através da CLAE ..... 26
3.7 CROMATOGRAFIA GASOSA (CG) ..... 27
3.7.1 A cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-FID) ..... 27
3.7.2 Identificação dos componentes ..... 27
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA ..... 28
**4 RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 28**
4.1 TESTE DE *Allium cepa* ..... 28
4.1.1 Capacidade proliferativa dos extratos aquosos e do óleo de *Origanum majorana* ..... 28
4.1.2 Genotoxicidade dos extratos aquosos e do óleo de *Origanum majorana* ..... 32
4.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS ..... 36
4.2.1 Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE) ..... 36
4.2.2 Cromatografia Gasosa (CG) ..... 37
**5 CONCLUSÕES ..... 41**
**REFERÊNCIAS ..... 43**
**ANEXO A – LAUDO DA ANÁLISE DE SOLO ..... 49**

# 1 INTRODUÇÃO

Ao longo da história da humanidade, as plantas medicinais sempre se fizeram presentes, sendo utilizadas para o tratamento e cura de doenças. No Brasil essa prática favorecida devido à grande biodiversidade. O aumento do interesse da população por terapias alternativas e produtos naturais, propiciando o crescimento do mercado de plantas medicinais e aromáticas de forma expressiva (MARTINS, 2000).

Aliada à biodiversidade existente no Brasil, tem-se a diversidade étnica e cultural, trazendo conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais, o que favorece o desenvolvimento de pesquisas resultantes em tecnologias que permitem a melhoria de vida da população (BRASIL, 2006). Sendo assim, os saberes populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para o conhecimento dos benefícios terapêuticos das plantas com amplo uso pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos (MACIEL et al., 2002).

Devido ao uso indiscriminado de plantas medicinais, a medicina convencional vem identificando crescentes problemas relacionados a efeitos colaterais negativos como, alergias e intoxicação. Com isso, a fitoterapia, a homeopatia, os florais, entre outros, são importantes alternativas para pessoas com acesso restrito a medicamentos de alto custo e que buscam métodos naturais como tratamento (EMBRAPA, 2007a).

A ideia equivocada da população de que as plantas medicinais, pelo fato serem naturais, não oferecem riscos de efeitos colaterais, deve ser repensada e deve se ter a consciências que elas podem possuir substâncias que se usadas sem um controle podem causar danos a saúde. Apesar de algumas plantas representarem fontes de medicamentos eficazes, o risco de intoxicação causado pelo uso indiscriminado deve ser sempre levado em consideração (LORENZI; MATOS, 2011).

Pelo fato de ser crescente o interesse no desenvolvimento de pesquisas com plantas medicinais deve-se levar em conta que os princípios ativos das plantas podem ser influenciados por fatores climáticos de forma simultânea, tais como: temperatura, umidade, altitude latitude. Estes fatores influenciam na produção e concentração de princípios ativos nas plantas. Alguns fatores técnicos também podem interferir como a época e a forma de colheita e transporte, a secagem e o armazenamento (CORRÊA; SCHEFFER, 2013).

Dentre estes fatores, cabe ressaltar que o método de secagem de plantas medicinais é um processo crucial, tendo como objetivo retirar a água da planta, reduzindo assim os teores

de umidade para melhorar a capacidade de conservação e durabilidade, mantendo suas qualidades físicas e químicas por mais tempo (RADÜNZ et al., 2002).

Considerando as plantas utilizadas na medicina popular, destaca-se a do gênero *Origanum*, que é conhecido pelas suas propriedades medicinais e condimentares. São representantes deste gênero o orégano (*Origanum vulgare*) e a manjerona (*Origanum majorana*) (PRELA-PANTANO et al., 2009)., sendo esta segunda o foco principal deste estudo.

A manjerona tem como principais usos: o culinário, como tempero e condimento; medicinal por possuir propriedades analgésicas, antioxidantes e para alívio de cólicas; aromático na aplicação de Aromaterapia.

Neste contexto, para a utilização consciente e segura das plantas medicinais, são necessários estudos complementares que avaliem o potencial genotóxico e citotóxico das substâncias que essas plantas produzem. As referidas 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 (PASQUALLI, 2016).

O teste de *Allium cepa* tem sido utilizado como bioindicador de genotoxicidade de extratos e óleos de plantas (KUHN et al., 2015), o qual permite também determinar a capacidade de proliferação celular. É considerado um método direto que pode ser utilizado para medir os danos nos sistemas que estão expostos a agentes mutagênicos ou potenciais agentes cancerígenos, possibilitando a avaliação desses danos pela observação de alterações cromossômicas (TEDESCO; LAUGHINGHOUSE, 2012).

Neste contexto, o presente estudo justifica-se pela necessidade do conhecimento sobre a genotoxicidade e a capacidade proliferativa dos extratos aquosos e do óleo da manjerona, baseando-se no fato de que essa planta tem sido muito utilizada com fins terapêuticos para o tratamento de doenças humanas na medicina alternativa e também pelo seu uso na culinária.

O presente estudo tem por objetivos avaliar a genotoxicidade, atividade proliferativa dos extratos aquosos e óleo sobre ciclo celular de *Allium cepa* além de verificar a composição fitoquímica através de cromatografia.

# 2 REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 FAMÍLIA LAMIACEAE E GÊNERO *ORIGANUM*

A família Lamiaceae possui distribuição cosmopolita, incluindo aproximadamente 300 gêneros e 7500 espécies. No Brasil, ocorrem 28 gêneros e cerca de 350 espécies (SOUZA; LORENZI, 2008).

Muitas espécies das Lamiaceae têm importância hortícola e com uso culinário, na medicina caseira, indústria farmacêutica e cosmética (KRUPPA; RUSSOMANNO, 2008). Desta família fazem parte espécies de importância econômica, como o alecrim (*Rosmarinus officinalis*), lavanda (*Lavandula spp*.), manjericão (*Ocimum basilicum*), manjerona (*Origanum majorana*) e orégano (*Origanum vulgare*).

O gênero *Origanum*, possui mais de 205 espécies destacando-se *Origanum majorana* e *Origanum vulgare*, como as mais importantes. Essas duas espécies são bastante confundidas entre si, principalmente no sul do Brasil, onde o orégano é conhecido como manjerona (PRELA-PANTANO et al., 2009*)*, embora o orégano possua cheiro e sabor característico mais acentuados. No entanto, ambas são utilizadas para o preparo de chás (extratos aquosos), óleos, uso culinário e indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia.

## 2.2 O*riganum majorana* E SUA IMPORTÂNCIA MEDICINAL

*Origanum majorana* L., tem como sinônimo *Majorana hortensis* Moench é conhecida como manjerona (Figura 1), uma erva perene, cespitosa, de 0,30 - 0,60m de altura, com caules grisáceo-tomentosos. Possui folhas simples, opostas, ovaladas ou arredondado-elípticas, verde-acinzentadas e pilosas, tendo aroma forte e agradável (USP, 2004). Flores esbranquiçadas, róseas ou violáceas, dispostas em glomérulos e reunidas em inflorescências paniculadas trminais (EMBRAPA, 2007b). De acordo com Rodrigues et al., (2005), se desenvolve em locais de climas subtropicais e temperados, originária de lugares áridos da Europa meridional, e se espalhou por quase todo o mundo. No Brasil é cultivada principalmente em hortas e jardins.

Figura 1 – Plantas de *Origanum majorana* L.

Fonte: Arquivo pessoal. Santa Maria, 2016.

Para o preparo dos extratos aquosos de plantas medicinais alguns métodos como infusão, decocção e maceração com água são utilizados. A infusão consiste em verter água fervente sobre a droga vegetal e, em seguida, tampar ou abafar o recipiente por tempo determinado, é indicado para partes de plantas de consistência menos rígida tais como folhas, flores, inflorescências e frutos, ou que contenham substâncias ativas voláteis; na decocção a parte da planta é colocada em água e mantida em ebulição por tempo determinado, este método é indicado para partes com consistência rígida, tais como cascas, raízes, rizomas, caules, sementes e folhas coriáceas; a maceração em água consiste no contato do tecido vegetal com água, mantido em temperatura ambiente, com tempo determinado para cada planta, esse método é indicado para plantas que possuam substâncias que se degradam com o aquecimento (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011).

No caso da manjerona, a infusão é o método mais conhecido, sendo utilizado 20 g de ramos/ Litro de água, sendo indicada para alívio de cólicas, auxilia na eliminação de gases intestinais, combate catarros nasais; externamente é usada em queimaduras e machucaduras, estimula as contrações do útero, por isso, seu uso em excesso pode causar aborto (EMBRAPA, 2007b).

Suas propriedades mais conhecidas são a antimicrobiana, antioxidante e inseticida (GROSSMAN 2005), sedante, diurética, antiviral, estimulante e digestiva. Na alimentação é usada como conservante e antimicrobiano na indústria de carne (BUSTAMANTE, 1996).

Inicialmente a manjerona tinha sua utilização como aromatizante e flavorizante de alimentos, bebidas, medicamentos e mais tarde foram descobertas propriedades aromatizantes empregadas em perfumaria como aroma e fixador de perfumes (USP, 2004). Também

considerada uma erva culinária usado em vários alimentos como sopas, pizza, carne, molhos (SAXENA et al. 2016).

## 2.3 ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum majorana*

Denomina-se óleo essencial a mistura de hidrocarbonetos, álcoois e aromáticos encontrados nos tecidos de plantas, geralmente concentrados nas folhas, flores, sementes, rizomas e casca (ARAÚJO, 1995).

A extração dos óleos das plantas, sua separação e concentração e determinação de seus compostos é grande importância para a indústria. Com base nisso, existem de vários métodos de extração de óleos essenciais, mas a técnica de arraste de vapor pelo sistema Clevenger é o mais conhecido e bastante utilizado em escala laboratorial (SANTOS et al., 2004), que consiste na destilação e caracteriza-se por ser um método simples. O material a ser extraído é colocado em um recipiente por onde tem-se a passagem de uma corrente de vapor de água, com ou sem pressão. Como os óleos tem maior tensão de vapor do que a água, esses acabam por ser arrastados junto ao vapor e são conduzidas a um condensador, onde este vapor volta ao estado líquido e são recolhidos para um separador. Após, o óleo é retirado pelo processo de decantação (RODRIGUES, 2002).

O óleo essencial da manjerona é volátil e apresenta como composto majoritario o terpineol-4 (RODRIGUES, 2002). Além deste, possui como demais compostos o *cis*-sabineno hidrato, canfeno, terpinoleno, α-pineno, p-cimeno, β-pineno, α-terpineno, linalol (RODRIGUES, 2005). O óleo essencial apresenta cor amarela, com odor picante, canforáceo e amadeirado (KUFNER, 2010). O rendimento do óleo essencial das folhas frescas e secas da planta são 0,5% e 1,4%, respectivamente (RODRIGUES, 2002; USP, 2004), com uma variação entre 0,70% até 3% quando obtido da planta seca (USP, 2004). Na aromaterapia, o óleo essencial tem grande importância, sendo os métodos de aplicação mais comum nesta prática segundo Andrei et al. (2005) por pulverização e difusão aérea, inalação, compressas, banhos e massagens.

## 2.4 ESTUDO GENOTÓXICO UTILIZANDO O TESTE *Allium cepa*

A maioria das plantas medicinais que são utilizadas para o tratamento de doenças ainda não apresentam estudos suficientes no que se refere ao seu potencial citotóxico/mutagênico, o qual pode ser monitorado pelo uso do teste de *Allium cepa*

(BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007). Segundo Fiskesjö (1985), apesar do metabolismo vegetal ser diferente, este teste de *A. cepa* é um excelente parâmetro de análise citotóxica.

O teste *A. cepa*, é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) e é considerado um teste eficiente para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999; FACHINETTO *et al*., 2007).

O teste em *A. cepa* foi utilizado pela primeira vez por Levan (1938) para detecção da genotoxicidade. Fiskesjö (1985) realizou as primeiras adaptações do teste para a utilização no monitoramento ambiental, avaliação de compostos solúveis e insolúveis em água, até avaliação de efeitos de misturas complexas.

A cebola é um bioindicador eficiente para observação da ocorrência de citotoxidade e genotoxicidade, seus cromossomos são fáceis de analisar em termos de tamanho, número e morfologia (MATSUMOTO et al. 2006). Os resultados do teste de *A. cepa* são considerados como alerta a outros organismos. Estudos de sensibilidade e correlação entre os sistemas teste de bioindicadores são fundamentais para avaliação mais precisa dos riscos ambientais e para extrapolação dos dados a outros grupos de organismos alvo (FISKESJÖ, 1985).

O teste de *A. cepa* é um método direto que pode ser utilizado para medir os danos nos sistemas que estão expostos a agentes mutagênicos ou potenciais agentes cancerígenos, e permite a avaliação dos efeitos destes danos através da observação de alterações cromossômicas. Para isso, é necessário que o organismo em estudo permaneça em divisão mitótica constante, sendo possível identificar os efeitos tóxicos e alterações ao longo do ciclo celular (TEDESCO; LAUGHINGHOUSE, 2012).

## 2.5 MÉTODOS DE SECAGEM DE PLANTAS MEDICINAIS: NATURAL E EM FORNO MICRO-ONDAS

O uso de plantas medicinais frescas seriam o ideal para o consumo medicinal, pois garante uma ação mais eficaz dos poderes curativos nelas presentes, porém nem sempre isso é possível. Então, para melhor conservá-las é possível aplicar o método de secagem, que sendo bem conduzido, permite que essas propriedades permaneçam no material por maior período de tempo (RODRIGUES, 2004).

A secagem de plantas medicinais tem como objetivo fazer com que estas contenham baixos teores de umidade, o que permite a conservação adequada das mesmas, mantendo sua

qualidade física e química por mais tempo (RADÜNZ et al., 2002). O modo pelo qual a planta é seca pode vir a provocar modificações físicas e químicas negativas, podendo ocorrer mudanças na aparência como coloração, cheiro e até possíveis perdas de constituintes voláteis (MELO; RADÜNZ; MELO, 2004).

Logo após a colheita, o processo de degradação das plantas se inicia devido ao aumento da atividade enzimática, na qual ocorre a degradação de princípios ativos presentes nas mesmas, e o processo de secagem minimiza estes efeitos (ROCHA, 2011). As plantas medicinais são sensíveis ao processo de secagem, portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas para avaliar as possíveis variações nas concentrações de seus princípios ativos quando submetidas a diferentes processos de secagem (MELO; RADÜNZ; MELO, 2004).

Desse modo, as plantas produtoras de óleos essenciais exigem maior atenção à secagem em razão da volatilidade dos óleos essenciais. É importante a escolha metodologias de secagem apropriadas para cada espécie, visando assegurar os teores de substâncias ativas presentes no material vegetal (CORRÊA et al., 2004)

As pesquisas sobre qual a influência dos processos de secagem e armazenamento na composição química das plantas medicinais, ainda são insuficientes, tornando-se necessárias mais pesquisas que abordem o tema (MARTINS, 2000).

Um dos métodos de secagem utilizados é o forno micro-ondas, que de acordo com Ohlsson (1990) apud Borgio (2007), requer um menor tempo de secagem, em torno de três minutos, isto se deve ao fato de que as moléculas da droga vegetal absorvem de forma uniforme a energia micro-ondas, resultando assim, numa rápida evaporação. Com as melhorias nos atributos de qualidade do produto e eficiência no processo de secagem, o micro-ondas apresenta um grande potencial a ser utilizado para a secagem de plantas medicinais (ROCHA, 2011). Há maior preservação do material vegetal seco em forno micro-ondas quando comparado com a secagem em estufa, pois com este método tem-se uma maior propensão de conservar os teores de compostos orgânicos presentes na amostra, como amido e carboidratos solúveis totais (PASTORINI et al., 2002). O uso de micro-ondas para secagem de amostras de folhas de alface não influenciou a porcentagem da matéria seca e os teores de macronutrientes do material, indicando assim, a viabilidade do uso destes método de secagem e preparo de amostras ( BORGES, 2011).

## 2.6 SISTEMAS DE CULTIVO DE PLANTAS MEDICINAIS

O cultivo de plantas medicinais é influenciado por vários fatores. Um produto de qualidade depende dos teores das substâncias de interesse, para isso alguns pontos na produção devem ser levados em consideração, como: manejo, colheita, beneficiamento e armazenamentos destas plantas (EMBRAPA, 2007b). Alguns fatores como temperatura, solo, umidade, luminosidade, latitude, longitude podem influenciar na qualidade e na concentração de princípios ativos presentes em plantas medicinais (AZEVEDO; MOURA, 2010).

Devido à baixa qualidade das plantas medicinais adquiridas no comércio, é cada vez mais comum a produção dessas plantas em vasos, varandas, jardins, quintais, hortos ou mesmo em áreas comerciais maiores, desde que sejam seguidos os manejos corretos. Esta é uma importante alternativa para aumentar a qualidade do material produzido, comercializado e utilizado no cuidado da saúde, e algumas vezes também como condimento (CARVALHO, 2015).

Entre os ambientes de cultivo existentes, dois deles serão discutidos neste trabalho: cultivo em campo (canteiros) e em estufa (em vasos). O ambiente de cultivo mais conhecido para produção de plantas medicinais é o cultivo no campo. É importante que se escolha um local, bem drenado, protegido de ventos fortes e que tenha uma boa adubação, que são requisitos básicos para a maioria das plantas medicinais (PEREIRA, 2013).

Outro ambiente utilizado para a produção de plantas medicinais é o cultivo protegido realizado em estufas, mas pode se dar também em túneis e ripados, construídos com estruturas de madeira ou metálicas. Este sistema possibilita o controle de variáveis climáticas como temperatura, umidade do ar, radiação solar e vento, diminuindo os danos causados por esses fatores (SILVA et al. 2014). Segundo Trani et al. (2010) as principais vantagens deste sistema de produção é o controle parcial do clima, protegendo a produção de danos causados por chuvas intensas e a possibilidade de produção de espécies sensíveis ao frio.

## 2.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) E CROMATOGRAFIA GASOSA (CG)

A análise da composição química das plantas é de grande importância, no que se refere à comercialização do produto, pois identificam os compostos mais atrativos à indústria farmacêutica e também serve como base aos produtores na seleção de genótipos mais eficientes para produção de produtos fitoterápicos (BEVILAQUA et al., 2001)

A cromatografia é utilizada para analisar extratos vegetais, possibilitando identificar a presença de compostos químicos na amostra em uma única análise, permitindo assim, estabelecer um parâmetro comparativo para reconhecimento da composição de extratos submetidos às mesmas condições de análise, possibilitando averiguar as semelhanças e diferenças destes (ALAERTS et al., 2007). De acordo com Peres (2002) os principais tipos de cromatografia são cromatografia em papel, cromatografia de camada delgada, cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência, sendo que o método empregado depender do material a ser analisado.

Neste trabalho destacamos a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a Cromatografia Gasosa (CG). A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) se desenvolveu muito nos últimos anos, recebendo o nome de cromatografia líquida por que a sua fase móvel é um solvente (PERES, 2002).

A CLAE é utilizada em análises de compostos não voláteis ou instáveis termicamente onde a cromatografia gasosa não pode ser utilizada. A cromatografia gasosa (CG) possibilita a análise de várias substâncias em uma mesma amostra, esta técnica permite se detectar até 10-12g do composto $mL^{-1}$ de solução, por ser sensível possibilita que pequenas quantidades de amostra possam ser analisadas.

# 3 MATERIAL E MÉTODOS

## 3.1 CULTIVO DAS PLANTAS DE *Origanum majorana*

As mudas foram compradas de um produtor comercial na região de Santa Maria – RS e foram cultivadas em dois ambientes: estufa plástica e em campo durante 60 dias (novembro de 2015 a janeiro 2016). As mudas eram uniformes e tinham aproximadamente 10 cm de altura.

No ambiente de cultivo em estufa, o experimento foi realizado no Departamento de Fitotecnica, Centro de Ciências Rurais na Universidade Federal de Santa Maria - UFSM (S 29º43’24,53” W 53º36’10,23”). Foram cultivadas 40 plantas de manjerona em vasos individuais com capacidade de 3 kg preenchidos com substrato comercial e mantidos sobre bancadas (Figura 2). O substrato utilizado foi da marca comercial H-Decker com a seguinte composição: turfa; casca de arroz carbonizada; aditivo com N (0,04%), $P_2O_5$(0,04%), $K_2O$ (0,05%) e calcário calcítico (1,5%). Durante o período de cultivo as plantas foram irrigadas com solução nutritiva padrão através do sistema de gotejamento duas vezes ao dia. Esta

solução, tem os nutrientes necessários para manter as plantas durante o tempo da pesquisa, já foi utilizada em outros experimentos no departamento de Fitotecnia. A composição da solução nutritiva padrão está descrita a seguir:

- Macronutrientes: 6,36 mmol.$L^{-1}$ de $NO_3$; 1,36 mmol.$L^{-1}$ de $NH_4$; 4 mmol.$L^{-1}$ de $K^+$; 1 mmol.$L^{-1}$ de $H_2PO_4$; 2,0 mmol.$L^{-1}$ de $Ca^{+2}$, 1 mmol.$L^{-1}$ de $Mg^{+2}$ e 1 mmol.$L^{-1}$ de $SO_4^{-2}$.
- Micronutrientes: 0,03 mg.$L^{-1}$ de Mo; 0,26 mg.$L^{-1}$ de B; 0,06 mg.$L^{-1}$ de Cu; 0,50 mg.$L^{-1}$ de Mn; 0,22 mg.$L^{-1}$ de Zn e 1,0 mg.$L^{-1}$ de Fe.

O experimento a campo foi conduzido em uma propriedade rural no município de Formigueiro – RS (S 29º59’46,96” W 53º36’10,23”), distante 45 km de Santa Maria. No campo 40 mudas foram plantadas em canteiros (figura 3) com espaçamento de 20 cm x 20 cm, sem irrigação artificial. Foi realizada uma analise de solo (Anexo A) para verificar sua fertilidade.

## 3.2 COLHEITA E PREPARO DAS AMOSTRAS

Decorrido o período de 60 dias de cultivo das plantas em campo e em estufa plástica as plantas foram coletadas para obtenção das amostras de folhas. Do total de massa fresca produzida em cada ambiente de cultivo, metade foi congelada logo após a pesagem para posterior extração de óleo. A outra parte restante também foi pesada e destinada à secagem através de dois métodos: em forno micro-ondas e secagem natural.

Figura 2 – Plantas de *Origanum majorana* L. cultivadas em canteiros no município de Formigueiro/RS.

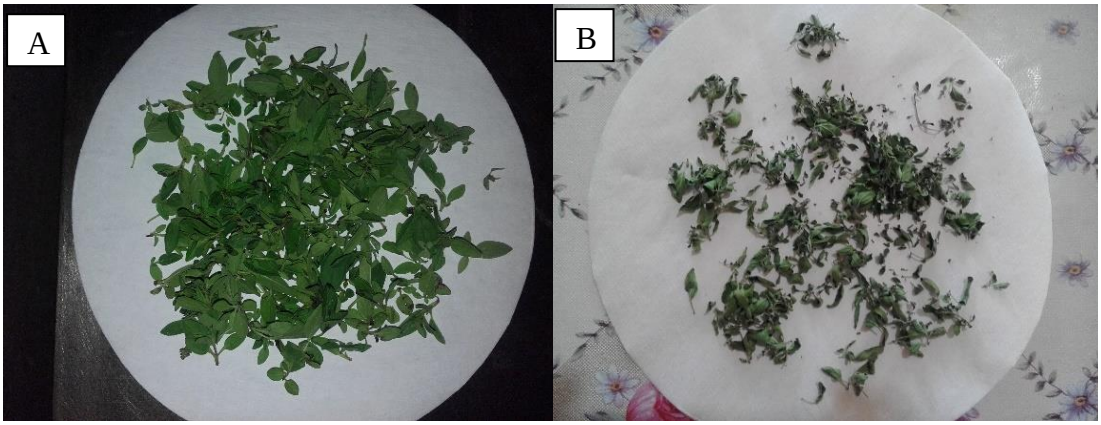
Fonte: Arquivo pessoal, Formigueiro (RS), 2015.

Figura 3 – Plantas de *Origanum majorana* L. cultivadas na estufa Departamento de Fitotecnia, UFSM.

Fonte: Arquivo pessoal, Santa Maria (RS), 2015.

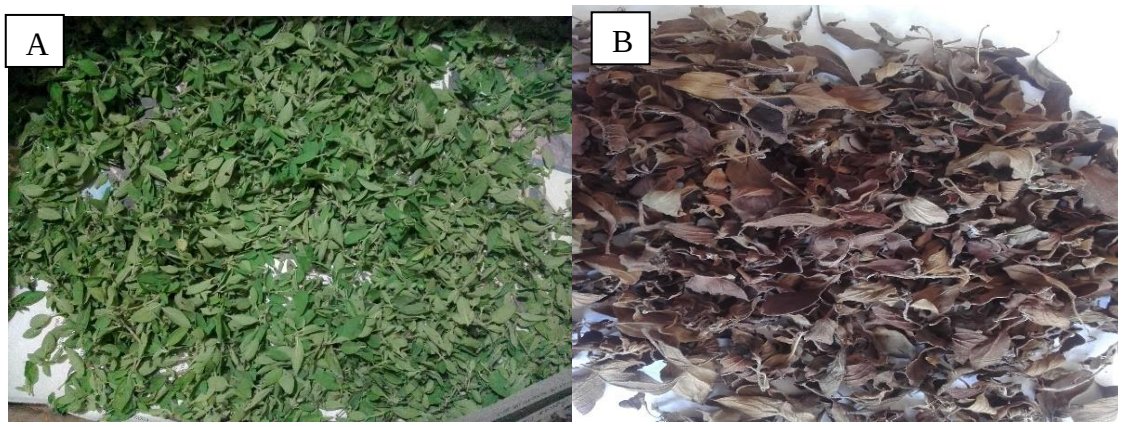
Na secagem em forno micro-ondas o material vegetal foi colocado sobre papel filtro e levado ao forno com 1200 Watts de potência até atingir um peso constante (aproximadamente 3 minutos) (Figura 4). Para a secagem ao natural, o material vegetal foi colocado em uma bandeja plástica forrada com papel toalha, permanecendo em bancada com temperatura média de 25º C, no Laboratório de Citogenética Vegetal – UFSM por 6 dias (Figura 5).

Figura 4 – Material vegetal seco em micro-ondas. (A) Massa fresca. (B) Massa seca.




Fonte: Arquivo pessoal, Santa Maria (RS), 2016.

Figura 5 – Material vegetal seco em temperatura ambiente (natural) à sombra. (A) Massa fresca. (B) Massa seca




Fonte: Arquivo pessoal, Santa Maria (RS), 2016.

## 3.3 PREPARO DOS EXTRATOS AQUOSOS

Os extratos aquosos que serviram para realizar o teste de genotoxicidade, capacidade prolifererativa e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foram obtidos a partir das folhas das plantas de manjerona cultivadas em estufa plástica e em campo.

Para o preparo dos extratos aquosos foram utilizados 6g e 12g de massa seca de manjerona em 1litro de água destilada, por meio de infusão por 10 minutos (Figura 6). Em seguida, os extratos foram coados e resfriados à temperatura ambiente. Uma parte foi utilizado como tratamentos nos bulbos de *Allium cepa* e outra parte foi encaminhada para o Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia Industrial do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM, para a realização da CLAE.

Figura 6 – Extratos aquosos preparados a partir da infusão de *Origanum majorana* L.

Fonte: Arquivo pessoal, Santa Maria, 2016.

## 3.4 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial foi extraído a partir de folhas frescas congeladas de *O. majorana* utilizando a 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 0,075%. A extração do óleo foi realizada no Laboratório de Farmácia Industrial do Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências de Saúde – CCS, na Universidade Federal de Santa Maria.

## 3.5 ANÁLISE DA GENOTOXICIDADE E DA PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO TESTE *IN VIVO* DE *Allium cepa*

O tecido meristemático das radículas de *Allium cepa* foi utilizado para a avaliação das alterações morfológicas e estruturais celulares e também para determinar os índices mitóticos.

Na etapa inicial, 65 bulbos de cebola adquiridos em um mercado do município de Santa Maria, foram colocados para enraizar em água destilada durante 72 horas. Após o enraizamento, foram formados 13 grupos (tratamento) cada um com 5 bulbos (repetições) para serem submetidos aos tratamentos por um período de 24 horas (Figura 7).

Os tratamentos estão dispostos a seguir:

- T1 - Controle negativo em água destilada.
- T2 - Glifosato 2% controle positivo.
- T3 - Extrato aquoso de folhas de manjerona por infusão de 6 $g.L^{-1}$; (cultivo em campo/secagem em micro-ondas).
- T4 - Extrato aquoso de folhas de manjerona. por infusão de 12 $g.L^{-1}$ (cultivo em campo/secagem em micro-ondas).
- T5 - Extrato aquoso de folhas de manjerona por infusão de 6 $g.L^{-1}$ (cultivo em campo/secagem natural).
- T6 - Extrato aquoso de folhas de manjerona por infusão de 12 $g.L^{-1}$ (cultivo em campo/secagem natural).
- T7 - Extrato aquoso de folhas de manjerona por infusão de 6 $g.L^{-1}$ (cultivo estufa/secagem em micro-ondas).
- T8 - Extrato aquoso de folhas de manjerona por infusão de 12 $g.L^{-1}$ (cultivo em estufa /secagem em micro-ondas).

- T9 - Extrato aquoso de folhas de manjerona por infusão de 6 $g.L^{-1}$ (cultivo estufa /secagem natural).
- T10 - Extrato aquoso de folhas de manjerona por infusão de 12 $g.L^{-1}$ (cultivo estufa/secagem natural);
- T11 - Etanol como controle da diluição do óleo
- T12 - Óleo de manjerona 0,075 % (cultivo em campo);
- T13 - Óleo de manjerona 0,075 % (cultivo em estufa).

Figura 7 – Bulbos de *Allium cepa* submetidos aos tratamentos com os controles (negativo e positivo), extratos aquosos e óleos de *Origanum majorana* L.

Fonte: Arquivo pessoal. Santa Maria (RS), 2016.

Decorrido o tempo de tratamento 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.

Na etapa seguinte, para o preparo das lâminas, foram coletadas radículas com aproximadamente 5 mm, as quais foram hidrolisadas em HCl 1N por 5 minutos e, após lavadas em água destilada, sendo estas utilizadas para a análise da divisão celular das raízes dos bulbos de cebola imersas nos tratamentos com os extratos e óleos de manjerona e nos tratamentos controle (água, glifosato e etanol).

A região meristemática foi esmagada com auxílio de um pequeno bastão de vidro, aplicada uma gota do corante orceína acética 2% (adaptada de GUERRA e SOUZA, 2002) e sobre o material e colocada lamínula. As lâminas foram observadas ao microscópio com o aumento de 40X, e então analisadas. No microscópio, foi feita a contagem total de células em divisão e calculado o índice mitótico (IM) baseando-se na porcentagem de células em divisão. Na análise das lâminas, foram contadas 1000 células por bulbo, totalizando 5000 células por

grupo de bulbos para cada um dos 13 tratamentos, num total de 65.000 células analisadas. O índice mitótico pode ser obtido pela divisão do número de células em divisões pelo número total de células observadas multiplicado por 100, obtendo-se o valor do IM em %.

## 3.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi empregada para determinação dos 'compostos fenólicos/flavonóides' presentes nos extratos/infusões das folhas de *Origanum majorana* 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. Metanol, ácido acético, ácido gálico, ácido rosmarínico, ácido clorogênico e ácido cafeico foram obtidos da Merk (Darmstadt, Germany). Quercetina, rutina, apigenina e luteolina foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). 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

Amostras de manjerona nas concentrações de 6 $g.L^{-1}$ e 12 $g.L^{-1}$ foram injetadas por meio de um modelo SIL-20A da Shimadzu Autosampler. As separações foram realizadas utilizando uma coluna Phenomenex $C_{18}$ (4.6 mm x 250 mm x 5 µm tamanho de partícula). A fase móvel foi água com ácido fórmico a 1% (v / v) (solvente A) e metanol (solvente B), com quociente de vazão de 0,6 $mL.min^{-1}$ e volume de injeção de 40 µL. A composição do gradiente foi: 5% de solvente que rompe a 15% em 10 min; 30% de solvente B em 25 min, 65% de solvente B em 40 min e 98% de solvente B em 45 minutos, seguido de 50 min a eluição isocrática até 55 min. Decorridos 60 minutos o gradiente alcançou as condições iniciais de novo, seguindo o método descrito por Duarte et al. (2016), com ligeiras modificações. 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. As soluções de reserva de referências padrões foram preparados no metanol: água (1: 1, v / v) numa gama de concentrações de 0,025-0,500 $mg.mL^{-1}$. Quantificações foram realizadas por integração dos picos utilizando o método do padrão externo a 257 nm para o ácido gálico; 325 nm para o ácido caféico, ácido rosmarínico e ácido clorogênico; e 366 para a rutina, apigenina, quercetina e luteolina. 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). Todas as operações de cromatografia foram realizadas à temperatura ambiente e em triplicata.

## 3.7 CROMATOGRAFIA GASOSA (CG)

As análises de cromatografia gasosa (GC) foram realizadas com um Agilent Technologies Sistema 6890N GC-FID equipado com uma coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm, espessura de película 0,25 mm) e ligado a um detector FID. As temperaturas do injector e do detector foram ajustadas para 280 ° C. O gás transportador era hélio, a um caudal de 1,0 mL / min. O programador térmico foi 50-300 ° C a uma taxa de 5 ° C / min. Duas repetições de amostras foram processadas da mesma maneira. As concentrações relativas dos componentes foram calculadas com base nas áreas de pico cromatografia gasosa sem utilizar fatores de correção. O volume de injeção do óleo essencial de *Origanum majorana* foi de 1 μL (Cunha et al., 2015).

### 3.7.1 A cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-FID)

As análises de GC-MS foram realizadas num sistema Agilent Technologies AutoSystem XL GC-MS operando no modo EI a 70 eV, equipado com um injetor split / splitless (250 ° C). A temperatura da linha de transferência foi de 280 ° C. Utilizou-se hélio como gás transportador (1,0 mL / min) e as colunas capilares utilizadas foram HP 5MS (30 mx 0,25 mm, espessura de película 0,25 mm) e HP Innowax (30 m x 0,32 mm i.d., espessura de película 0,50 mm). O programa de temperatura foi o mesmo que o utilizado para as análises GC. O volume injetado foi de 1 μL do óleo essencial.

### 3.7.2 Identificação dos componentes

A identificação dos constituintes do óleo essencial de *Origanum majorana* foi realizada com base no índice de retenção (RI), determinado com referência das séries homólogas de *n*-alcanos, C7-C30, em condições experimentais idênticas, comparando com a pesquisa da biblioteca de espectros de massa (NIST e Wiley), e com a literatura de espectros de massa data Adams (1995). As quantidades relativas dos componentes individuais foram calculadas com base na área do pico CG (resposta FID).

## 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental utilizado no experimento foi o inteiramente casualizado (DIC) em um arranjo trifatorial 2x2x2. Os resultados obtidos pelo teste de *Allium cepa* foram avaliados pelo teste Qui-quadrado ($\chi^2$), através do software BioEstat versão 5.3 (AYRES, 2007), com margem de erro de 5%. Os resultados obtidos pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro e como teste complementar foi aplicado o teste de Scott-Knott nível de significância de 5% de probabilidade de erro, para verificar se houve a interação dos fatores (ambiente de cultivo, método de secagem e concentração dos extratos), ambos utilizando software SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

# 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4.1 TESTE DE *Allium cepa*

### 4.1.1 Capacidade proliferativa dos extratos aquosos e do óleo de *Origanum majorana*

O ciclo celular foi analisado no sistema teste *in vivo* de *Allium cepa* e os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 1, onde são apresentados o número total de células analisadas, células em interfase, em divisão e o respectivo índice mitótico de cada tratamento.

Para facilitar o entendimento dos resultados foram adotadas as seguintes abreviações: índice mitótico (IM); cultivo em campo/secagem em micro-ondas (C/M); cultivo em campo/secagem natural (C/N); cultivo em estufa/secagem em micro-ondas (E/M); cultivo em estufa/secagem natural (E/N).

Com base no índice mitótico (IM) (Tabela 1) observa-se que o controle negativo (T1) foi diferente de todos os outros tratamentos, percebendo-se uma redução significativa da proliferação celular de *A. cepa* em todos os tratamentos testados.

Quando os distintos tratamentos foram comparados com controle positivo apenas o T6 (IM = 0,76) e T10 (IM = 0,02) apresentaram IM inferior ao encontrado no T2 (IM = 0,82), destes apenas o T10 obteve uma diferença significativa, com valor de $\chi^2$ T2 X T10 =38,256. Os tratamentos T9 e T6 não diferiram do controle positivo (T2), sendo os valores do $\chi^2$ para as comparações: T9 x T2 = 0,107 e T2 x T6 = 0,115. Apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao controle positivo os tratamentos T1, T3, T4, T5, T7, T8 e T10 com valores de comparação: T1 x T2 = 642,068; T2 x T3 = 241,910; T2 x T4 = 114,864; T2 x T5 = 47,128; T2 x T7 = 87,622; T2 x T8 = 121,373; T2 x T10 = 38,256 (Tabela 1).

As concentrações de 6 $g.L^{-1}$ e 12 $g.L^{-1}$ diferiram entre si tanto em C/M quanto em C/N (Tabela 1).

Ainda considerando os resultados demonstrados na Tabela 1, a concentração de 6 $g.L^{-1}$ e cultivo em campo nos diferentes tipos de secagem a comparação T3 x T5 com valor do $\chi^2$ = 96,983 indica que houve diferença significativa entre os tratamentos. Na concentração de 12 $g.L^{-1}$, cultivo em campo e nos métodos de secagem, os tratamentos T4 e T6 tiveram seus índices mitóticos 4,16 e 0,76, respectivamente, com diferença significativa $\chi^2$ = 120,443.

Para os tratamentos T7 e T8 (E/M) com concentrações, respectivamente, 6 $g.L^{-1}$ e 12 $g.L^{-1}$, não diferiram entre si ($\chi^2$: T7 x T8= 3,626), o T8 também não diferiu do tratamento com concentração 12 $g.L^{-1}$ (T4) com cultivo em campo e secagem em micro-ondas ($\chi^2$: T8 x T4 = 0,121). (Tabela 1)

O IM dos tratamentos T5 (IM = 2,60) e T9 (IM = 0,88), com concentração de 6 $g.L^{-1}$, secagem natural e cultivados nos diferentes ambientes, diferiram entre si, com o valor de $\chi^2$ para a comparação T5 x T9 = 43,258. Assim como, na concentração 12 $g.L^{-1}$ (T6 e T10), diferiram entre si ($\chi^2$: T6 x T10 = 35,240). (Tabela 1)

Quando a comparação se dá entre os ambientes de cultivo, levando em consideração a secagem em micro-ondas, a concentração de 6 $g.L^{-1}$ para os tratamentos T3 (IM = 6,76) e T7 (IM = 3,56) obteve como resultado de $\chi^2$: T3 x T7 = 52,312, indicando que houve diferença significativa entre os tratamentos. Na concentração 12 $g.L^{-1}$ para os tratamentos T4 (IM = 4,16) e T8 (IM = 4,30) o valor encontrado de $\chi^2$: T4 x T8 = 0,121, não havendo diferença significativa (Tabela 1).

Os resultados apresentados sobre a avaliação dos extratos aquosos de manjerona, sobre o ciclo celular de *Allium cepa* demonstraram que houve uma redução significativa no índice

mitótico em todos os tratamentos aplicados, isto é, a divisão celular diminuiu quando submetidos aos tratamentos em relação com o controle negativo (água destilada). A maior redução da divisão celular ocorreu nos extratos das plantas cultivadas em estufa e secagem natural na concentração de 12 $g.L^{-1}$, ficando abaixo até mesmo do controle positivo. Em relação ao método de secagem, os tratamentos com secagem natural foram os que demonstram maior redução do índice mitótico. A concentração de 12 $g.L^{-1}$ reduziu a divisão celular na maioria dos tratamentos, excetuando-se os tratamentos T8 (IM = 4,30) que manteve o valor do índice mitótico em relação ao T7 (IM = 3,56), onde não houve diferença significativa.

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 *Origanum majorana* L.

| Tratamentos | Total de células analisadas | Células em interfase | Células em divisão | Índice Mitótico (%) |
|---|---|---|---|---|
| T1 – Água destilada (controle negativo) | 5000 | 4292 | 708 | 14,16 a* |
| T2 – Glifosato 2% (controle positivo) | 5000 | 4959 | 41 | 0,82 gh |
| T3 – Extrato aquoso 6 $g.L^{-1}$ /cultivo campo/secagem em micro-ondas | 5000 | 4662 | 338 | 6,76 b |
| T4 – Extrato aquoso 12 $g.L^{-1}$/ cultivo campo/secagem em micro-ondas | 5000 | 4792 | 208 | 4,16 cd |
| T5 – Extrato aquoso 6 $g.L^{-1}$/cultivo campo/secagem natural | 5000 | 4870 | 130 | 2,60 f |
| T6 – Extrato aquoso 12 $g.L^{-1}$/cultivo campo/secagem em natural | 5000 | 4962 | 38 | 0,76 ghi |
| T7 – Extrato aquoso 6 $g.L^{-1}$/cultivo em estufa/ secagem em micro-ondas | 5000 | 4822 | 178 | 3,56 cde |
| T8 – Extrato aquoso 12 $g.L^{-1}$/cultivo em estufa/ secagem em micro-ondas | 5000 | 4785 | 215 | 4,30 c |
| T9 – Extrato aquoso 6 $g.L^{-1}$/cultivo em estufa/ secagem natural | 5000 | 4956 | 44 | 0,88 gh |
| T10 – Extrato aquoso 12 $g.L^{-1}$/cultivo em estufa/ secagem natural | 5000 | 4999 | 1 | 0,02 j |

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

Resultados semelhantes foram encontrados por Tedesco et al. (2012) que ao analisarem as infusões de *Mentha pulegium*, observaram a ação antiproliferativa destes extratos e Pavanello (2014) que em estudo dos extratos aquosos de preparados a partir das

folhas e frutos de *Cordia trichotoma* nas concentrações de 5 $g.L^{-1}$ e 20 $g.L^{-1}$ verificaram o efeito antiproliferativo.

Outros autores também utilizaram o sistema teste *A. cepa* para analisarem a capacidade antiproliferativa de extratos aquosos de algumas espécies. Pastori et al. (2015) verificou a atividade antiproliferativa das infusões de *Polygonum punctatum* E. nas concentrações de 0,4 $g.mL^{-1}$ e 2,4 $g.mL^{-1}$. Pasqualli et al. (2015) verificaram em estudo que os extratos aquosos das folhas secas e *in natura* preparados por infusão e os extratos crus das folhas *in natura* de *Allophylus edulis* (A.St.-Hil., Cambess. & A. Juss.) Radlk possuem potencial antiproliferativo sobre o ciclo celular de *A. cepa*.

As infusões das inflorescências de *Achyrocline satureioides* DC., nas concentrações de 5,0 mg $mL^{-1}$ e 20 mg $mL^{-1}$, demonstraram que os extratos aquosos de marcela inibiram significativamente a divisão celular do tecido meristemático das radículas de *A. cepa*, em ambas as concentrações estudadas nas plantas recém coletadas e nas armazenadas (Fachinetto et al. 2007). Estudando os efeitos das infusões de populações de *Mikania cordifolia* (L. f.) W., nas concentrações de 8 g $L^{-1}$ e 32 g $L^{-1}$, Dias et al. (2014) verificaram que houve inibição significativa da divisão celular em ambas às concentrações, ao analisar o tecido meristemático das raízes.

Na tabela 2 são apresentados os resultados referentes à capacidade proliferativa dos tratamentos com óleos essenciais das folhas de manjerona, utilizando como controle negativo a água destilada, controle positivo o glifosato 2% e etanol para o controle da diluição do óleo.

Conforme a tabela 2 verifica-se que existe diferença significativa entre os óleos essenciais e os controles negativo e positivo. O índice mitótico dos óleos 0,075% das plantas de manjerona cultivadas em campo (T12), com IM = 6,46 e em estufa (T13) com IM = 7,88 diminuíram significativamente em relação ao controle negativo (T1) com IM = 14,16 apresentando valores de $\chi^2$: T1 x T12 = 160,295 e T1 x T13 = 100,551.

Quando comparados ao controle positivo T2 (IM = 0,82), os tratamentos T12 com IM = 6,46 e T13 com IM = 7,88 ocorreu um aumento nos valores do índice mitótico, $\chi^2$: T2 x T12 = 226,725 e T2 x T13 = 299,485. Dos óleos 0,075 % apenas o T13 diferiu do etanol ($\chi^2$: T11 x T13 = 20,675). A comparação entre os óleos de *O. majorana* 0,075% diferiram estatisticamente tendo $\chi^2$: T12 x T13 = 7,574, sendo que o cultivo em campo houve uma maior inibição do IM (Tabela 2).

Tabela 2 – Número de células meristemáticas de *Allium cepa* L. analisadas em interfase, em divisão e os índices mitóticos (IM) dos controles e tratamentos com óleos a 0,075% das folhas de *Origanum majorana* L.

| Tratamentos | Total de células analisadas | Células em interfase | Células em divisão | Índice Mitótico (%) |
|---|---|---|---|---|
| T1 – Água destilada (controle negativo) | 5000 | 4292 | 708 | 14.16 a* |
| T2 – Glifosato 2% (controle positivo) | 5000 | 4959 | 41 | 0.82 e |
| T11 - Etanol controle do óleo | 5000 | 4720 | 280 | 5.6 cd |
| T12 - Óleo 0,075% cultivo campo | 5000 | 4677 | 323 | 6.46 c |
| T13 - Óleo 0,075% cultivo estufa | 5000 | 4606 | 394 | 7.88 b |

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

O teste *Allium cepa* foi utilizado como bioindicador por outros autores para analisar a capacidade antiproliferativa de óleos essenciais de plantas medicinais. Frescura (2014), analisou o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. nas concentrações de 3 e 10 %, observou uma redução na divisão celular de *Allium cepa*, sendo que na concentração de 10 % o efeito antiproliferativo foi maior. O efeito do óleo essencial foi analisado por Pinheiro (2016), que utilizou óleo de alecrim em concentração de 0,20 % demonstrando que a só apresentou-se antiproliferativo o óleo extraído das plantas que permaneceram por mais tempo sob condições de salinidade (50 dias antes da coleta).

### 4.1.2 Genotoxicidade dos extratos aquosos e do óleo de *Origanum majorana*

A genotoxicidade foi observada através do teste in vivo de *Allium cepa* a partir do qual se obteve os resultados observados na Tabela 3, onde são apresentados o número total de células analisadas, células em interfase, em divisão e o número de alterações cromossômicas.

De acordo com estes resultados, todos os tratamentos diferiram estatisticamente do controle negativo (T1), o qual não apresentou nenhuma alteração cromossômica. Os tratamentos T6 e T9 não tiveram diferença significativa quando comparados com o controle positivo (T2), sendo o valor de $\chi^2$: T2 x T6 = 3,706; T2 x T9 = 5,549.

As células analisadas em T3 e T4 que foram expostas aos extratos aquosos das plantas cultivadas em campo e secagem em micro-ondas nas concentrações 6 $g.L^{-1}$ e 12 $g.L^{-1}$, diferiram entre si($\chi^2$: T3 x T4 = 29,422). Já os extratos das plantas cultivadas em estufa, com

o mesmo método de secagem nas duas concentrações (T7 e T8), não tiveram diferença significativa entre si em relação ao aparecimento de alterações cromossômicas (Tabela 3).

Nos ambientes de cultivo na concentração de 6 $g.L^{-1}$ e secagem em micro-ondas, os tratamentos T3 e T7, apresentaram 6 e 2 alterações cromossômicas, respectivamente, diferindo entre si com $\chi^2$ = 49,069. O mesmo pode ser observado na comparação dos tratamentos T6 e T10 com valor de $\chi^2$: T6 x T10 = 36,952, os quais apresentaram 2 e 0 alterações cromossômicas, respectivamente. Com isto podemos observar que o cultivo em campo apresenta maior número de alterações (Tabela 3).

Tabela 3 – Número de células meristemáticas de *Allium cepa* L. analisadas em interfase, em divisão e as alterações cromossômicas dos controles e tratamentos com extratos aquosos das folhas de *Origanum majorana* L.

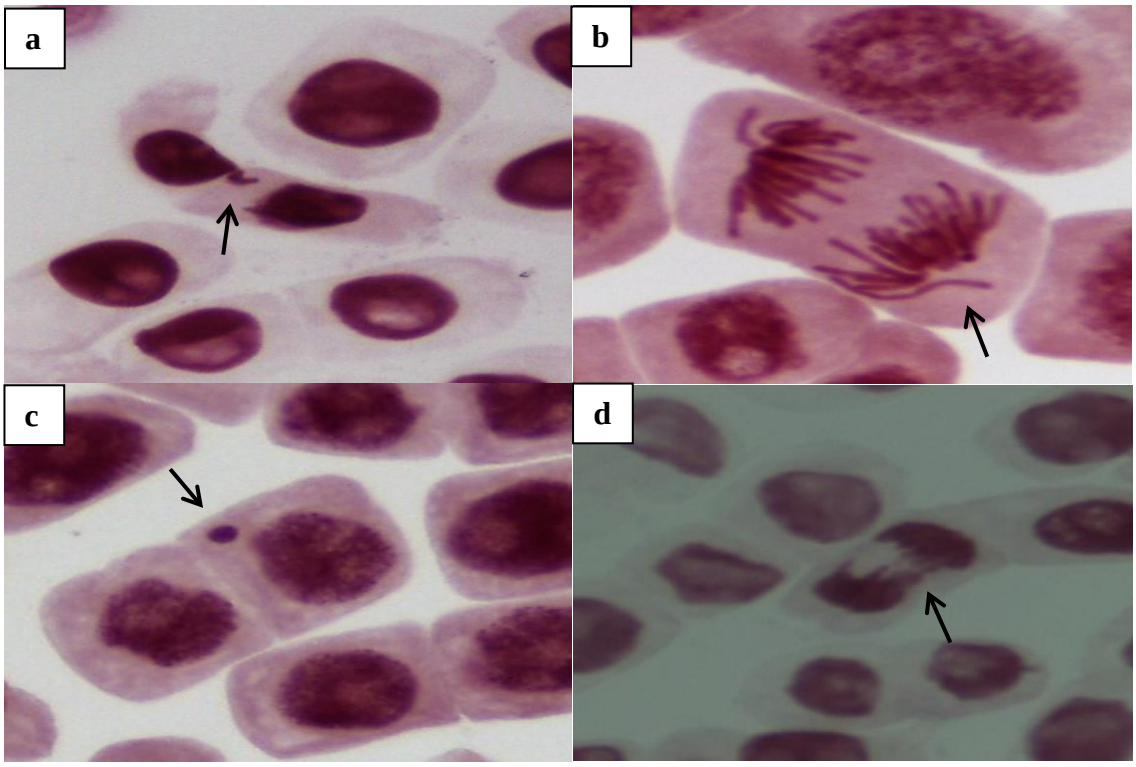
| Tratamentos | Total de células analisadas | Células em interfase | Células em divisão | Número de alterações |
|---|---|---|---|---|
| T1 – Água destilada (controle negativo) | 5000 | 4292 | 708 | 0 j |
| T2 – Glifosato 2% (controle positivo) | 5000 | 4959 | 41 | 8 a* |
| T3 – Extrato aquoso 6 $g.L^{-1}$ /cultivo campo/secagem em micro-ondas | 5000 | 4662 | 338 | 6 b |
| T4 – Extrato aquoso 12 $g.L^{-1}$/ cultivo campo/secagem em micro-ondas | 5000 | 4792 | 208 | 5 c |
| T5 – Extrato aquoso 6 $g.L^{-1}$/cultivo campo/secagem natural | 5000 | 4870 | 130 | 4 d |
| T6 – Extrato aquoso 12 $g.L^{-1}$/ cultivo campo/secagem em natural | 5000 | 4962 | 38 | 2 ae |
| T7 – Extrato aquoso 6 $g.L^{-1}$/ cultivo em estufa/ secagem em micro-ondas | 5000 | 4822 | 178 | 2 f |
| T8 – Extrato aquoso 12 $g.L^{-1}$/ cultivo em estufa/ secagem em micro-ondas | 5000 | 4785 | 215 | 2 fg |
| T9 – Extrato aquoso 6 $g.L^{-1}$/ cultivo em estufa/ secagem natural | 5000 | 4956 | 44 | 1 aeh |
| T10 – Extrato aquoso 12 $g.L^{-1}$/ cultivo em estufa/ secagem natural | 5000 | 4999 | 1 | 0 i |

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste $\chi^2$ em nível de 5% de significância

Os tipos de secagens (micro-ondas e natural), quando cultivadas em campo, na concentração de 6 $g.L^{-1}$ ($\chi^2$: T3 x T5 = 88,671) e 12 $g.L^{-1}$ ($\chi^2$: T4 x T6 = 115,879), diferem estatisticamente. Ainda levando em considerações as diferentes secagens, com cultivo em estufa, nas concentrações 6 $g.L^{-1}$ ($\chi^2$: T7 x T9 = 79,448) e 12 $g.L^{-1}$ ($\chi^2$ T8 e T10 = 209,546) também foram observadas diferenças significativas. (Tabela 3)

De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 3, os extratos aquosos 12 g.L$^{-1}$/ cultivo campo/secagem natural (T6) e 6g.L$^{-1}$/ cultivo em estufa/ secagem natural (T9), possuem feito genotóxico. Observa-se na Figura 8, algumas alterações como cromossomos perdidos (8a) quebra cromossômica (8b), micronúcleo (8c) e ponte (8d), encontradas nos tratamentos com os extratos aquosos de manjerona.

Figura 8 – Células meristemáticas de *Allium cepa* L. com alterações cromossômicas.




As setas em **a** e **b** indicam cromossomo perdido dos tratamentos com óleo essencial 0,075% cultivo em campo e do extrato aquoso de O*riganum. majorana* com concentração de 12 g.L$^{-1}$, cultivo em campo e secagem micro-ondas, respectivamente. A seta em **c** indica a presença de micronúcleo no extrato aquoso de *Origanum majorana* L. de concentração de 6 g.L$^{-1}$, cultivo em estufa e secagem natural e a seta **d** indica a ponte em telófase no extrato aquoso de 6 g.L$^{-1}$, cultivo em campo e secagem micro-ondas.
Fonte: Arquivo pessoal, Santa Maria, 2016.

Resultados semelhantes foram encontrados por Dias et al. (2014), que ao analisar as infusões de *Mikania cordifolia*, nas concentrações 8 g.L$^{-1}$ e 32 g.L$^{-1}$, concluíram que estes possuem efeito genotóxico sobre o ciclo celular de *A. cepa*.

Comparando-se o número de células alteradas com o total de células analidas podemos dizer que os tratamentos T4 (infusões de 12 g.L$^{-1}$/cultivo campo/secagem em micro-ondas), T5 ( infusões de 6 g.L$^{-1}$/cultivo campo/secagem natural), T6 infusões de 12 g.L$^{-1}$/ cultivo campo/secagem em natural), T9 (6 g.L$^{-1}$/cultivo em estufa/ secagem natural), apresentam potencial genotóxico.

Algumas espécies como *Prunus myrtifolia* (L.) Urb. (TRAPP et al. 2015), *Psychotria birotula* Smith & Downs (FRESCURA, 2012), *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli, *Sagittaria montevidensis* Cham. & Schlecht (COELHO, 2013) e *Eugenia uniflora* L. (KUHN, 2015) também tiveram seus efeitos genotóxicos comprovados pelo teste de *A. cepa.*

Na Tabela 4 estão dispostos os resultados da genotoxicidade dos óleos de manjerona, a análise de qui-quadrado ($\chi^2$) foi feita levando em consideração o número de alterações em relação ao número total de divisões. O número de divisões foi utilizado como referência para a genotoxicidade, pois é onde pode-se observar as alterações cromossômicas. De acordo com os resultados demonstrados houve diferença significativa dos tratamentos utilizando os óleos 0,075 % com relação à água destilada ($\chi^2$: T1 x T12 = 563,721; T1 x T13 = 278,837), sendo que a agua não apresentou alterações e os tratamentos T12 e T13 apresentaram 5 e 2 alterações, respectivamente, apresentando potencial genotóxico.

O óleo obtido a partir das folhas da manjerona cultivada a campo (T12), não teve diferença significativa quando comparado ao etanol (T11), com $\chi^2$ da comparação T11 x T12 = 5,827. Já o T13 (cultivo em estufa) diferiu do controle da diluição ($\chi^2$: T11 x T13 = 25,415). Na comparação entre os dois tipos de cultivo (T12 e T13), não foi verificada diferença estatística ($\chi^2$: T12 x T13 = 7,886).

Tabela 4 – Número de células meristemáticas de *Allium cepa* L. analisadas em interfase, em divisão e as alterações cromossômicas dos controles e óleos de *Origanum majorana* L.

| Tratamentos | Total de células analisadas | Células em interfase | Células em divisão | Número de alterações |
|---|---|---|---|---|
| T1 – Água destilada (controle negativo) | 5000 | 4292 | 708 | 0 e |
| T2 – Glifosato 2% (controle positivo) | 5000 | 4959 | 41 | 8 b |
| T11 - Etanol (controle do óleo) | 5000 | 4720 | 280 | 12 a* |
| T12 - Óleo cultivo campo | 5000 | 4677 | 323 | 5 ac |
| T13 - Óleo cultivo estufa | 5000 | 4606 | 394 | 2 cd |

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

Com isto pode-se notar que todos os tratamentos diferiram estatisticamente do glifosato 2% (controle positivo), que serve como parâmetro para demonstrar o que se considera genotoxicidade (Tabela 4). A partir dos dados analisados, notou-se que todos os

tratamentos diferiram de maneira significativa do controle positivo para genotoxicidade, representado neste teste pelo glifosato 2%.

Observa-se diferença dos tratamentos com os óleos essenciais quando comparados ao controle negativo (água), devido a estes tratamentos apresentarem alterações como ponte anafásica, quebra cromossômica, podendo lhes ser atribuído potencial genotóxico. (Tabela 4).

A genotoxicidade dos óleos essenciais também foi verificada por Kuhn et al. (2015) em trabalho realizado com óleo de *Eugenia uniflora* L. a 0,25 % e por Pinheiro (2016) em estudo com óleo de *Rosmarinus officinalis* L. a 0,20%. Pasqualli (2016) em trabalho com óleo essencial de *Bacharis dracunculifolia* L., concluiu que o óleo 0,05% da espécie, extraído de uma população de São Pedro do Sul-RS, não é genotóxico.

## 4.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

### 4.2.1 Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE)

Conforme a Tabela 5, o componente com maior concentração nos extratos aquosos de manjerona em todos os tratamentos foi o ácido clorogênico, a diferença ficou com o segundo maior componente que nos tratamentos T3, T4 e T7 foi o ácido rosmarínico e nos tratamentos T5, T6, T8, T9, T10, o ácido clorogênico foi seguido pelo acido gálico.

Levando em consideração os ambientes de cultivo, houve a redução na concentração dos dois elementos majoritários no T3 cultivo em campo (ácido clorogênico 4,2 $mg.g^{-1}$ e ácido rosmarínico 3,03 $mg.g^{-1}$) quando comparado ao T7 com cultivo em estufa (ácido clorogênico 6,00 $mg.g^{-1}$ e ácido rosmarínico 4,32 $mg.g^{-1}$). Na concentração de 12 $g.L^{-1}$ e secagem em micro-ondas, o ácido gálico reduziu significativamente sua quantia de 8,66 $mg.g^{-1}$ em estufa (T8) para 2,41 $mg.g^{-1}$ em campo (T4). É possível, que a irrigação com solução nutritiva tenha influenciado nas concentrações dos componentes químicos dos extratos aquosos das folhas de manjerona (Tabela 5).

Quanto ao ácido clorogênico, os tratamentos com concentração de 6 $g.L^{-1}$ não diferiram significativamente entre os métodos de secagem. Tomando como base a concentração de 6 $g.L^{-1}$, o ácido gálico não foi influenciado pelo método de secagem. Na concentração de 12 $g.L^{-1}$ este mesmo componente apresentou diferença significativa dos métodos de secagem, tanto cultivo em estufa quanto em campo (Tabela 5).

Tabela 5 – Compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos das folhas de *Origanum majorana* L. cultivadas em campo e estufa, secagem em micro-ondas e natural e em duas concentrações, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência.

| | Componentes ($mg.g^{-1}$) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Tratamentos** | Ác. Gálico | Ác. clorogênico | Ác. cafeíco | Ác. Rosmarinico | Rutina | Quercitina | Luteolina | Apigenina |
| T3 – 6 g..L$^{-1}$/campo/micro | 1,28 f C | 4,2 f A | 1,18 e C | 3,03 f B | 0,37 bc D | 0,5 c D | 0,70 cd D | 1,19 bc C |
| T4 – 12 g..L$^{-1}$/campo/micro | 2,41 e C | 8,25 d A | 2,34 b C | 6,08 b B | 0,56 abc D | 0,71 bc D | 1,12 b D | 2,48 a C |
| T5 – 6 g..L$^{-1}$/campo/natural | 2,29 e B | 4,49 f A | 1,72 d C | 2,21 g B | 0,20 c D | 0,53 c D | 0,49 d D | 0,45 d D |
| T6 – 12 g..L$^{-1}$/campo/natural | 4,99 c B | 9,35 c A | 3,03 b D | 4,11 e C | 0,46 abc F | 1,06 ab E | 1,05 bc E | 1,04 bc E |
| T7 – 6 g..L$^{-1}$/estufa/micro | 4,30 d B | 6,00 e A | 2,76 b C | 4,32 d B | 0,40 bc D | 0,51 c D | 0,72 cd D | 0,40 d D |
| T8 – 12 g..L$^{-1}$/estufa/micro | 8,66 a B | 11,04 b A | 5,17 a C | 8,61 a B | 0,71 ab E | 1,10 ab ED | 1,39 b D | 0,91 c E |
| T9 – 6 g..L$^{-1}$/estufa/natural | 4,32 d B | 6,05 e A | 0,87 e E | 2,82 f C | 0,4 bc F | 0,42 c F | 1,23 c DE | 1,30 b C |
| T10 – 12 g..L$^{-1}$/estufa/natural | 7,27 b B | 11,96 a A | 1,80 d E | 5,08 c C | 0,84 a F | 0,79 abc F | 2,31 a A | 2,62 a A |

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey em nível de 5% de significância. Na linha as letras maiúsculas é o desdobramento de cada componente dentro do tratamento. Na coluna as letras minúsculas é o desdobramento cada tratamento dentro do componente.

A quantidade mais elevada de ácido clorogênico pode estar associada à capacidade antiproliferativa demonstrados, assim como os componentes ácido rosmarínico e ácido gálico que também se apresentam em quantidades significativas nos extratos aquosos das folhas de manjerona de ambos os ambientes de cultivo e secagem. A capacidade antiproliferativa do ácido rosmarinico foi verificada por Kuhn (2015) em análise dos extratos aquosos das plantas *Peltodon longipes* Kunth ex Benth do acesso Tupanciretã.

### 4.2.2 Cromatografia Gasosa (CG)

A análise cromatográfica do óleo essencial extraído das folhas de *O. majorana,* na concentração de 0,075%, (Tabela 6) detectou a presença das seguintes substâncias: α-Tujeno, α-Pineno, Sabineno β-Pineno, Mirceno, -Terpineno, p-Cimeno, Limoneno, Ocimeno, γ-Terpineno, Linalol, cis-Sabineno hidrato, Terpineno-4-ol, α-Terpineol, Geraniol, Thimol, Geranil acetato, β-cariofileno, α-Cadideno, Spatulenol, Oxido de cariofileno.

Os componentes majoritários presentes nos óleos essenciais de *O. majorana* em ambos os ambientes de cultivo foram Terpineno-4-ol (campo 32,49% e estufa 39,25) e *cis*-Sabineno hidrato (campo 12,27% e estufa 16,06%). (Tabela 6)

Alguns componentes que se fazem presentes no cultivo em estufa não estão presentes no cultivo no solo como é o caso do ocimeno, linalol, geranil acetato, pode ser que a irrigação com solução nutritiva tenha influenciado nestes resultados, sendo necessários estudos mais aprofundados (Tabela 6).

Outros autores analisaram o óleo essencial de manjerona como Valeriano et al. (2012) identificaram as seguintes substâncias em maiores proporções: 38,17% de terpineno-4-ol, 7,71% de γ-terpineno, 6,50% de p-cimeno e 3,84% de α-terpineno, Freire (2008) identificou como componentes majoritários terpineno-4-ol (34,23%) e γ-terpineno (14,28) (Tabela 6).

Tabela 6 – Composição do óleo essencial das folhas de *Origanum majorana* L. a cultivadas em campo e estufa, na concentração de 0,075% obtida por cromatografia gasosa.

| **Componentes** | **RI[a]** | **RI[b]** | **Manjerona cultivo em campo (%)** | **Manjerona cultivo em estufa (%)** |
|---|---|---|---|---|
| α-Tujeno | 926 | 927 | 0.31 | 0.25 |
| α-Pineno | 941 | 939 | 0.48 | 0.76 |
| Sabineno | 975 | 976 | 5.01 | 5.83 |
| β-Pineno | 983 | 980 | 0.16 | 0.39 |
| Mirceno | 987 | 991 | 1.49 | 1.78 |
| α-Terpineno | 1019 | 1018 | 2.84 | 2.35 |
| *p*-Cimeno | 1025 | 1026 | 6.53 | 7.09 |
| Limoneno | 1031 | 1031 | 1.08 | 1.27 |
| Ocimeno | 1052 | 1050 | - | 0.22 |
| γ-Terpineno | 1063 | 1062 | 6.83 | 8.11 |
| Linalol | 1096 | 1098 | - | 0.13 |
| *cis*-Sabineno hidrato | 1099 | 1099 | 12.27 | 16.06 |
| Terpineno-4-ol | 1176 | 1177 | 32.49 | 39.25 |
| α-Terpineol | 1189 | 1185 | 4.30 | 2.98 |
| Geraniol | 1249 | 1250 | 0.15 | 0.09 |
| Thimol | 1287 | 1287 | 0.09 | 0.16 |
| Geranil acetato | 1365 | 1364 | - | 0.07 |
| β-cariofileno | 1418 | 1418 | 2.48 | 1.23 |
| α-Cadideno | 1536 | 1538 | 0.93 | 1.18 |
| Spatulenol | 1575 | 1576 | 0.61 | 0.25 |
| Oxido de cariofileno | 1584 | 1581 | 0.11 | - |
| **Total (%)** | | | 78.16 | 89.45 |

As proporções relativas de óleo essencial estão expressas em porcentagens. RI[a] Índice de Retenção experimental(baseado em séries homólogas de *n*-alcano $C_7$-$C_{30}$). RI[b] Índice de literatura (Adams, 1995).

Óleos essenciais podem ser utilizados na indústria alimentícia como condimentos e aromatizantes. O óleo de manjerona é conhecido pelas propriedades antimicrobianas e inseticidas (FREIRE, 2008), em estudo feito por Valeriano et al. (2012), com óleo de manjerona apresentou alta atividade antibacteriana para *Escherichia coli* ((5.973 UA $mL^{-1}$) e atividade moderada para *Salmonella enteritidis* e *Enterobacter sakazakii* (1.706 e 2.346 UA $mL^{-1}$, respectivamente). A atividade antibacteriana do óleo pode ser devido ao γ-terpineno, pois estudos relatam apresentar atividade antimicrobiana (CARSON; RILEY, 1995) e terpineno-4-ol possui capacidade bacteriostática contra alguns microrganismos (BAREL et al., 1991).

Alguns componentes presentes no óleo são aromáticos como o hidrato de *cis*-sabineno, α-terpineno, 4-terpineol, α-terpineol (SAXENA et al., 2016). Na aromaterapia, alguns grupos funcionais dos óleos podem ser utilizados, entre eles: monoterpenos como pineno e limoneno possuem efeito antisséptico, anti-inflamatório; álcoois como linalol e borneol estimulam o sistema imunológico; entre outros (ANDREI et al., 2005).

## 4.3 INTERAÇÃO ENTRE AMBIENTE DE CULTIVO E MÉTODO DE SECAGEM COM RELAÇÃO AOS TRATAMENTOS CONSIDERANDO O INDICE MITÓTICO (IM).

Na tabela 7 estão apresentadas as médias para os ambientes de cultivo, método de secagem e tratamentos, respectivamente. Observando-se as médias dos ambientes de cultivo nota-se que houve diferença significativa entre eles, sendo que o cultivo em estufa apresentou maior capacidade antiproliferativa do que o cultivo em campo.

Quanto à secagem, o método natural (IM= 4,27) apresentou o índice mitótico menor do que o forno micro-ondas (IM= 6,08), isto é, os extratos preparados a partir de folhas com secagem natural tem maior capacidade antiproliferativa (Tabela 7).

As concentrações dos extratos aquosos de manjerona tiveram diferença significativa quando comparadas com a água (controle negativo) e com o glifosato (controle positivo). Na comparação com a água com IM = 14,12, as concentrações de 6 $g.L^{-1}$ e 12 $g.L^{-1}$ com IM = 3,45 e 2,31, respectivamente, apresentam maior capacidade antiproliferativa. Mas em relação ao glifosato (IM= 0,82), os IMs das concentrações 6 $g.L^{-1}$ e 12 $g.L^{-1}$ foram maiores, significando que o controle positivo (glifosato) é mais antiproliferativo. (Tabela 7)

Os tratamentos com as distintas concentrações quando comparados entre si, diferem estatisticamente, a concentração de 12 $g.L^{-1}$ tiveram um IM menor, sendo maior sua capacidade proliferativa (Tabela 7). Com isto podemos verificar, que quanto maior as concentração maior o efeito antiproliferativo.

Tabela 7 – Valores médios para o ambiente de cultivo, método de secagem e tratamento referente ao índice mitótico dos extratos aquosos de *Origanum majorana* L.

| Índice Mitótico | | |
|---|---|---|
| **Ambiente de Cultivo** | Campo | 5,52 a* |
| | Estufa | 4,83 b |
| **Método de secagem** | Micro-ondas | 6,08 a |
| | Natural | 4,27 b |
| **Tratamento** | Água | 14,12 a |
| | Glifo | 0,82 d |
| | 6 $g.L^{-1}$ | 3,45 b |
| | 12 $g.L^{-1}$ | 2,31 c |

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Teste Scott-Knott, em nível de significância de 5%.

Na Tabela 8 estão dispostos os resultados dos desdobramentos interação de tratamento (água, glifosato, extratos aquosos na concentração de 6$g/L^{-1}$ e 12$g/L^{-1}$) dentro de cada ambiente de cultivo (campo e estufa) levando em consideração o índice mitótico (IM). Com relação aos ambientes de cultivo: campo e estufa, os tratamentos com as concentrações e controles (água e glifosato), pode se observar que a água obteve o maior IM e o glifosato menor IM, ambos diferindo das concentrações (6 $g.L^{-1}$ e 12 $g.L^{-1}$).

Dentro do cultivo em campo quando observadas as duas concentrações (Tabela 8), verifica-se que houve diferença significativa, sendo que o IM do tratamento com extratos aquosos de manjerona nas concentrações de 6 $g.L^{-1}$ é de 4,68 e o de 12 $g.L^{-1}$ é de 2,16, sendo que o segundo se apresenta como mais antiproliferativo. Quando o ambiente de cultivo é em estufa, as concentrações estudadas não diferem estatisticamente entre si quanto ao IM (Tabela 8).

Tabela 8 – Desdobramento da interação de tratamento dentro de cada ambiente de cultivo referente ao índice mitótico dos controles e extratos aquosos de *Origanum majorana* L..

| **Tratamento** | **Tipo de Cultivo** | |
|---|---|---|
| | **Campo** | **Estufa** |
| Água | 14,12 a* | 14,12 a* |
| Glifosato 1% | 0,82 d | 0,82 c |
| 6 $g.L^{-1}$ | 4,68 b | 2,22 b |
| 12 $g.L^{-1}$ | 2,46 c | 2,16 b |

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Teste Scott-Knott, em nível de significância de 5%.

Pode-se observar na Tabela 9, o resultado do desdobramento da interação e tratamento (água, glifosato, extratos aquosos de manjerona na concentração de 6 $g.L^{-1}$ e 12 $g.L^{-1}$) dentro de cada método de secagem (natural e em forno micro-ondas). No método de secagem em forno micro-ondas analisando o índice mitótico, as concentrações 6 $g.L^{-1}$ e 12 $g.L^{-1}$ diferiram quando comparadas à água e ao glifosato, mas não houve diferença significativa quando comparadas entre si.

Na secagem natural, os tratamentos com extratos aquosos de manjerona nas duas concentrações apresentadas nesse trabalho não diferiram estatisticamente do glifosato, quando analisado o índice mitótico dos tratamentos. (Tabela 9)

Pode se verificar também que as médias dos IMs das duas concentrações de infusões são menores na secagem natural, do que na secagem em forno micro-ondas, sendo que possivelmente a secagem em natural tenha maior potencial antiproliferativo (Tabela 9).

Tabela 9 – Desdobramento da interação de tratamento dentro de cada método de secagem referente ao índice mitótico dos controles e extratos aquosos de *Origanum majorana* L..

| **Tratamento** | **Método de secagem** | |
|---|---|---|
| | **Micro-ondas** | **Natural** |
| Água | 14,12 a | 14,12 a* |
| Glifosato | 0,82 c | 0,82 b |
| 6g/L | 5,16 b | 1,74 b |
| 12g/L | 4,23 b | 0,39 b |

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Teste Scott-Knott, em nível de significância de 5%.

## 5 CONCLUSÕES

Os extratos aquosos de *Origanum majorana* apresentam atividade antiproliferativa e genotoxicidade nas concentrações de 6 $g.L^{-1}$ e 12 $g.L^{-1}$ em ambos os ambientes de cultivo e métodos de secagem.

Os óleos essenciais das folhas de *Origanum majorana* cultivadas nos ambientes de campo e estufa na concentração 0,075% possuem atividade antiproliferativa e potencial genotóxico.

Os compostos majoritários dos extratos aquosos de manjerona foram: ácido clorogênico, acido gálico e ácido rosmarínico.

Houve diferença na concentração dos componentes majoritários dos extratos aquosos comparados os ambientes de cultivos e métodos de secagem.

Os componentes majoritários presentes nos óleos essenciais de manjerona em ambos os ambientes de cultivo são Terpineno-4-ol e *cis*-Sabineno hidrato, sendo que concentração do Terpineno-4-ol é maior no cultivo em estufa. Há a redução na quantidade de ácido clorogênico quando as plantas são cultivadas em campo.

Houve diferença nos no índice mitótico dos tratamento em relação ao cultivo em campo e não se observa diferença entre as concentrações no cultivo em estufa.

Não houve diferenças entre os tratamentos dentro de cada método de secagem referente o índice mitótico nas concentrações de 6 $g.L^{-1}$ e 12 $g. L^{-1}$.

## REFERÊNCIAS


ALAERTS, G.; MATTHIJS, N.; VERBEKE, J.; HEYDEN, Y. Chromatographic fingerprint development for herbal extract: A screening and optimization methodology on monolithic columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1172, n. 1, p.1-8, 2007.

ANDREI, P.; DEL COMUNE, A.P. **Aromaterapia e suas aplicações**. Cadernos. Centro Universitário São Camilo, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 57-68, out./dez. 2005.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos** – Teoria e Prática – Óleos Essenciais. Ed. Imp. Univ. UFV: Viçosa – MG, 1995.

ARGENTON, A. **Conceitos fundamentais de Cromatografia a líquido de Alto Desempenho (HPLC)**. Minicurso CRQ – 2010. Conselho Regional de Química IV Região (SP). Disponível em <http://www.crq4.org.br/sms/files/file/conceitos_hplc_2010.pdf>. Acesso em 05 de janeiro de 2017.

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

BAGATINI, M. D.; FACHINETTO, J. M.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B.. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.3, p.444-447, Set., 2007. ISSN 0102-695X.

BAREL, S.; SEGAL, R.; YASHPHE, J. The antimicrobial activity of the essential oil from *Achillea fragrantissima*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.33, n.1/2, p.187-91, 1991.

BEVILAQUA, G. A. P.; NEDEL, J. L.; ZUANAZZI, J. A.; CORREA, C. T. Distribuição geográfica e composição química do chapéu-de-couro (Echinodorus spp.) no Rio grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 32, n. 2, p. 213-218, 2001.

BORGES, B. M. M.N. Métodos de determinação da matéria seca e dos teores de macronutrientes em folhas de alface. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**,v. 5, n. 1, p. 12-16, abr., 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** Brasília, DF, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. 1. ed. Brasília, DF, 2011. 126p

BRASILEIRO, B.G. et al. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no "Programa de Saúde da Família", Governador Valadares, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** São Paulo, vol. 44, n. 4, out./dez., 2008.

BUSMANTE, F.M.L. Plantas Medicinales y Aromáticas. Estudio, **Cultivo y processo**. 1996. 460 p.

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

CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.78, n.3, p.264-9, 1995.

COELHO A. P. D.; KUHN A. W.; TEDESCO S. B.; CANTO-DOROW T. S. Avaliação do potencial antiproliferativo de chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus* Mich.) pelo teste de *Allium Cepa*. **XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil.** Bento Gonçalves, RS. 2012**.**

COELHO, A. P. D. **Potencial genotóxico e antiproliferativo dos extratos de Echinodorus grandiflorus e Sagittaria montevidensis (Alismataceae)**. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2013.

CORRÊA, C. SCHEFFER, M. C. . **Boas Práticas Agrícolas (BPA) de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares. Série Informação Técnica**. Curitiba: Instituto Emater, 2013. 52 p. ISBN: 978-85-63667-32-8

CORRÊA, R.M. et al. Rendimento de óleo essencial e caracterização organoléptica de folhas de assa-peixe submetidas a diferentes métodos de secagem. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 2, p. 339-344, mar./abr., 2004.

DIAS, M.G.; CANTO-DOROW, T.S.; COELHO, A.P.D.; TEDESCO, S.B. Efeito genotóxico e antiproliferativo de Mikania cordifolia (L. F.) Willd. (Asteraceae) sobre o ciclo celular de Allium cepa L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v.16, n.2, p.202-208, 2014.

DUARTE, A.E., et al. Polyphenolic composition and evaluation of antioxidant activity, osmotic fragility and cytotoxic effects of *Raphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer. **Molecules**, 21: 2, p. 1-15, 2016.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. Embrapa Clima Temperado. Identificação e Tecnologia de plantas medicinais da flora de clima temperado. **Circular Técnica.** Pelotas, RS: Embrapa, 2007. 29 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. Manjerona. **Série Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas**. Corumbá, MS. 2007.

FACHINETTO, J.M. et al. Efeito antiproliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.17, p.49-54, 2007.

FERRARA, L.K.; MONTESANTO, D.; CHIANTESE,C. *Origanum marjorana* L. in medicine na foods. Ingredientia Alimentaria, v.2, p.23-25, 2003.

FERREIRA, D. F. **Sisvar 5.3**: Suporte econômico - CAPES, CNPq.

FREIRE, J. M. **Óleos essenciais de canela, manjerona e anis-estrelado: caracterização quimica e atividade biológica sobre *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Aspergilus***

***parasiticus***. 2008. 68 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2008.

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

FRESCURA, V.D.S. **Avaliação do potencial antiproliferativo, genotóxico e antimutagênico das espécies *Psychotria brachypoda* (MÜLL. ARG.) BRITON E *Psychotria birotula* SMITH & DOWNS (RUBIACEAE)**. 2012. 74p. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2012.

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

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

GROSSMAN, L. **Óleos essenciais na culinária, cosmética e saúde.** São Paulo: Optinline, 2005. 300 p.

KRUPPA, P. C.; RUSSOMANNO, O.M.R. Ocorrência de fungos em sementes de plantas medicinais, aromáticas e condimentares da família Lamiaceae. **Tropical Plant Pathology**. v.33, n.1, p.72-75, jan./fev., 2008.

KUFNER, D. E. **Atividade antioxidante do extrato aquoso de manjerona (*Origanum majorana* L.), em linguiça frescal de frango**. 2010, 56p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim: URI, 2010.

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.** 2015. Disponível em http://dx.doi.org/10.1080/00087114.2014.998525.

LEVAN, A.The effect of colchicine on root mitosis in *Allium***. Hereditas**, v.24, p. 471-486.1938.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. As Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas – 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora,2008. 544p. Reimpresso em março de 2011 com algumas correções e revisão ortográfica.

MACIEL, M. A. M; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V.F. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. Quim. Nova, Vol. 25, No. 3, 429-438, 2002.

MARTINS, P.M. **Influência da temperatura e da velocidade do ar de secagem no teor e na composição química do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf)**. 2000. 77p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa: UFV, 2000.

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

MELO, E.C; RADÜNZ, L.L; MELO, R.C.A Influência do processo de secagem na qualidade de plantas medicinais- Revisão. **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, MG, v.12, n.4, 307-315, Out./Dez., 2004.

OLIVEIRA, K.B. **Determinação do ácido rosmarínico em *Salvia officinalis* L., Lamiaceae, e avaliação de sua toxicidade e influência na melanogênese.** 2010. 147 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2010.

PASQUALLI, M.; TEDESCO, M.; TEDESCO, S. B. Potencial antiproliferaivo 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.

PASQUALLI, M. **Potencial antiproliferativo, antigenotóxico e análise fitoquímica dos extratos aquosos e do óleo de *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae)**, 2016. 47 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2016.

PASTORINI, L. H.; BACARIN, M. A.; ABREU, C.M. Secagem de material vegetal em forno de microondas para determinação de matéria seca e análises químicas. **Ciênc. agrotec**. Lavras. v.26, n.6, p.1252-1258, nov. / dez., 2002.

PASTORI, T. et al. Ação genotóxica e antiproliferativa de *Polygonum punctatum* Elliott (Polygonaceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L.. **Revista Brasileira Plantas Medicinais**, Campinas, v.17, n.2, p.186-194, 2015.

PAVANELO, L.B. **potencial antiproliferativo e Determinação de compostos fenólicos de Cordia trichotoma (vell.) Arráb. Ex Eteud.** 2014. 59 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2014.

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

PORTAL EDUCAÇÃO – Manjerona. Medicina Alternativa. 2012. Disponível em <http://www.portaleducacao.com.br/medicina-alternativa/artigos/17365/manjerona#ixzz3dPZ9duBD>. Acesso em: 13 jul. 2016.

PRELA-PANTANO, A.; TERAMOTO, J.R.S.; FABRI, E.G. **O cultivo e a comercialização de orégano.** 2009. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_2/Oregano/index.htm>. Acesso em: 10 jun. 2016.

RADÜNZ L.L.; MELO E.C.; MARTINS P.M. Secagem de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) em secador de leito fixo. **Revista Brasileira Plantas Medicinais** v.5, p. 79-82. 2002.

ROCHA, R.P. **Avaliação do teor e da composição do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e *Thymus vulgaris* submetidos a processos de secagem e armazenamento**. 2011. 75 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

ROCHA, R. P.; MELO, E.C.; RADÜNZ L.L. Determination of moisture content from guaco with microwave. **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, MG, v.19 N.6, nov/dez. 503-509 p. 2011.

RODRIGUES, R. M. M. S. et al. Matérias estranhas e identificação histológica em manjerona (*Origanum majorana* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e salsa (*Petroselinum sativum* Hoffim.), em flocos, comercializados no estado de São Paulo. **Revista Inst. Adolfo Lutz**, 64(1):25-30, 2005.

RODRIGUES, M. R. A. **Estudo dos óleos essenciais presentes em manjerona e orégano**. 2002. 181 p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

RODRIGUES, V. G. S. Cultivo, uso e manipulação de plantas medicinais. Porto Velho: **Embrapa Rondônia**, 2004. 25 p. ISSN 0103-9865.

SANTOS, A. S. Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. **Comunicado Técnico**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Belém, PA. 6p. Nov. 2004. ISSN 1517-2244

SAXENA D.; JAYANT, S.K.; SONI, K.; NEEKHRA, K. *Origanum majorana*: a potencial herb for functional food. **European jornal of pharmaceutical and medical research**. 2016, 3(2), p. 321-325. 2016. ISSN 3294-3211.

SIMÕES, C. M. O. S. et al. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2002 p., 2004.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias Fanerógamas do Brasil, baseado em APG II**. 2 ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, 2008. 703p.

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

TEDESCO, S. B.; e LAUGHINGHOUSE H. D. Bioindicator of Genotoxicity: The Allium cepa Test In: SRIVASTAVA, J. **Environmental Contamination**. Rijeka: InTech, 2012. Cap. 8, p. 137-157

TRANI, P. E. **Hortaliças e plantas medicinais: manual prático**. 2ª ed. revisada e atualizada. Campinas: Instituto Agronômico, 2010. 72 p. online. (Série Tecnologia APTA, Boletim Técnico IAC, 199). ISSN: 1809-7936.

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.

TRAPP, et al. Análise proliferativa e fitoquímica de *Commelina erecta* L. pelo teste *Allium cepa* L. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.13 n.24; p. 64-75, 2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**. Plantas Medicinais. São Paulo**, 2004. Disponível em <http://ci-67.ciagri.usp.br/pm/ver_1pl.asp?f_cod=102>. Acesso em: 10 jun. 2016.

VALERIANO, C.; PICCOLI, R.H.; CARDOSO, M.G.; ALVES, E. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira Plantas Medicinais**, Botucatu, v.14, n.1, p. 57-67, 2012.

# ANEXO A – LAUDO DA ANÁLISE DE SOLO

**MEC - Universidade Federal de Santa Maria**
**Centro de Ciências Rurais - Departamento de Solos**

Santa Maria/RS Cep:97105-900
Fone: (55) 3220-8153
http://www.ufsm.br/solos

**Laudo de Análise de Solo**

Departamento de Solos UFSM

**Informações fornecidas e de responsabilidade do solicitante**

**Solicitante:** Micheli Bortoluzzi Baldoni **CPF/CNPJ:** 010.618.940-96
**Proprietário:** Micheli Bortoluzzi Baldoni **CPF/CNPJ:** 010.618.940-96
**Município:** Formigueiro / RS **Endereço:**
**Localidade:** **Entrada:** 26/10/16 **Emissão:** 08/11/16
**Matrícula:**

| Registro no LAS | Identificação da amostra | Área (ha) | Sistema de cultivo | Prof. (cm) | Georref. |
|---|---|---|---|---|---|
| 25908 | Horta | 10m² | | | |

**Informações emitidas pelo laboratório e de responsabilidade do técnico**

Diagnóstico para acidez do solo e calagem

| Registro no LAS | pH água 1:1 | Ca | Mg | Al | H+Al | CTC efet. | Saturação (%) | | Índice SMP |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | cmol$_c$/dm³ | | | | | Al | Bases | |
| 25908 | 6,8 | 3,6 | 1,1 | 0,0 | 1,1 | 4,9 | 0,0 | 81,8 | 7,2 |

Diagnóstico para macronutrientes e recomendação de adubação NPK-S

| Registro no LAS | % MO | % Argila | Textura | S | P-Mehlich | C Total* | K | CTC pH7 | K |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ----------m/v---------- | | | ----------mg/dm³--------- | | ---g.kg⁻¹--- | ---------cmol$_c$/dm³-------- | | mg/dm³ |
| 25908 | 1,1 | 12,0 | 4,0 | --X-- | 236,7 | --X-- | 0,215 | 6,0 | 84,0 |

Diagnóstico para micronutrientes e relações molares

| Registro no LAS | Cu | Zn | B | Fe | Mn | Na | Relações Molares | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ----------mg/dm³---------- | | | | | | Ca/Mg | (Ca+Mg)/K | K/(Ca+Mg)$^{1/2}$ |
| 25908 | --X-- | --X-- | --X-- | --X-- | --X-- | --X-- | 3,1 | 21,80 | 0,099 |

Os dados analíticos são de exclusividade da amostra
Vinculado à ROLAS-RS/SC

SELO DE QUALIDADE
ANÁLISE BÁSICA +MICRONUTRIENTES
ROLAS 2016

Assinatura digital
**21-8E-2F-CB-C2-63-BA-F7-63-8B-B8-E2-24-96-D4-0D**
Para autenticar acesse http://silas.ccr.ufsm.br, em "Autenticar" informe a sequência acima.

**Responsável técnico:** Gustavo Brunetto - CREA/RS 204807

Pagamento Realizado
* Determinado em analisador elementar-combustão seca