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

Carmine Aparecida Lenz Hister

PRODUÇÃO DA FITOMASSA, ANÁLISE FITOQUÍMICA E POTENCIAL CITOGENOTÓXICO DE TOMILHO (*THYMUS VULGARIS* L.)

Santa Maria, RS
2021

Carmine Aparecida Lenz Hister

PRODUÇÃO DA FITOMASSA, ANÁLISE FITOQUÍMICA E POTENCIAL CITOGENOTÓXICO DE TOMILHO (*THYMUS VULGARIS* L.)

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

Orientador: Profª Drª Solange Bosio Tedesco

Santa Maria, RS
2021

HISTER, Carmine Aparecida Lenz
PRODUÇÃO DA FITOMASSA, ANÁLISE FITOQUÍMICA E POTENCIAL CITOGENOTÓXICO DE TOMILHO (THYMUS VULGARIS L.) / Carmine Aparecida Lenz HISTER.- 2021.
96 p.; 30 cm

Orientadora: Profª Drª Solange Bosio Tedesco
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Agronomia, RS, 2021

1. Allium cepa. 2. Citogenotoxicidade. 3. Cromatografia. 4. Estações climáticas. 5. Fitomassas. I. Bosio Tedesco, Profª Drª Solange II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, CARMINE APARECIDA LENZ HISTER, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Carmine Aparecida Lenz Hister

PRODUÇÃO DA FITOMASSA, ANÁLISE FITOQUÍMICA E POTENCIAL CITOGENOTÓXICO DE TOMILHO (*THYMUS VULGARIS* L.)

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

Aprovado em 22 de outubro de 2021:

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

Antônio Carlos Ferreira da Silva, Dr (UFSM)

Viviane Dal-Souto Frescura, Drª (UFSM)

Ionara Fatima Conterato, Drª (SEAPDR)

Thais Scotti do Canto Dorow, Drª (UNIFRA)

Santa Maria, RS
2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por iluminar meus passos, me guiando pelo melhor caminho e me fazendo chegar até este momento tão especial.

Aos meus familiares, meus pais, José e Griselda, e meu irmão, Dionei, que mesmo distantes sempre foram incentivadores de meus estudos. Obrigada pelo apoio incondicional nesta caminhada. Espero poder orgulhá-los sempre.

Ao meu marido, Jonas, pelo companheirismo, incentivo e por não me deixar desistir, mesmo após várias tentativas fracassadas de ingresso no doutorado. Esta conquista é sua também.

Ao meu filho e meu maior tesouro, Martin, que veio durante o doutorado, em meio a uma pandemia, mas que me ensinou tanto em tão pouco tempo.

À Universidade Federal de Santa Maria, pelo ensino gratuito e de qualidade, na qual finalizo mais este ciclo de muito aprendizado.

À melhor orientadora, Professora Solange Bosio Tedesco, que me “aguenta” desde a graduação. Obrigada pela orientação e pela amizade, bem como, pelo auxílio e apoio nas dificuldades ocorridas ao longo deste estudo. E, principalmente, pela liberdade e confiança em mim depositadas.

Ao Professor Jerônimo Luiz Andriolo, pela orientação e viabilização de toda a infraestrutura para a realização dos experimentos em estufa.

À TAE, Vanessa Amaral Ribeiro, pela liofilização das amostras de extrato aquoso de tomilho.

Ao Laboratório de Extrativos Vegetais, em especial, às alunas Nadia e Isadora, e a Professora Berta Maria Heinzmann, por toda a colaboração e todo aprendizado nas análises cromatográficas do óleo essencial e do extrato aquoso de tomilho, assim como, as contribuições na parte escrita.

Às amigas e colegas do Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade, que cooperaram nos experimentos em estufa, na limpeza das caixas d’água, no transplante das mudas e na colheita de tomilho.

Aos demais mestres do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, por todo o aprendizado, que muito contribuiu para a minha formação.

Enfim, as inúmeras pessoas que conheci ao longo deste doutorado, que ajudaram indiretamente nesta pesquisa, pela troca de conhecimento, pelo apoio,

pela curiosidade. Foi um ciclo gratificante, de muito trabalho e de um aprendizado imensurável.

A todos, o meu muito obrigada!

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

(Leonardo Da Vinci)

RESUMO

PRODUÇÃO DA FITOMASSA, ANÁLISE FITOQUÍMICA E POTENCIAL CITOGENOTÓXICO DE TOMILHO (*THYMUS VULGARIS* L.)

AUTORA: Carmine Aparecida Lenz Hister
ORIENTADORA: Solange Bosio Tedesco

O tomilho (*Thymus vulgaris* L.) vem despertando o interesse de pesquisadores por seu amplo emprego na indústria alimentícia e cosmética, além de sua utilização com fins medicinais. Objetivou-se analisar a influência das estações climáticas, inverno e verão, e de diferentes concentrações de nitrogênio, sobre a produção da fitomassa, do rendimento e do teor do óleo essencial de tomilho, bem como elucidar a composição química do óleo essencial nas duas estações, assim como avaliar o potencial de citogenotoxicidade tanto dos extratos aquosos, como do óleo essencial das plantas cultivadas. Os experimentos de inverno e de verão foram conduzidos em estufa, no período de 2018 a 2020. A massa fresca e seca foi avaliada para calcular a produção de fitomassa, e a produção de óleo essencial foi avaliada quanto ao rendimento e ao teor. A cromatografia líquida e gasosa foi utilizada para determinar a composição química dos extratos aquosos e do óleo essencial de tomilho, respectivamente. O teste de *Allium cepa* foi empregado na análise do potencial citogenotóxico. O delineamento utilizado no experimento em estufa foi o inteiramente casualizado, conduzido em esquema fatorial (2X5), em duas estações do ano e cinco concentrações de nitrogênio na solução nutritiva (5, 7, 9, 11 e 13 $mmol.L^{-1}$). Todos os dados foram submetidos à análise de variância. Os dados referentes à produção de fitomassa, de rendimento e de teor do óleo essencial foram analisados por Skott-Knott e regressão polinomial. Os dados relativos ao teste de *A. cepa* foram comparados pelo teste de Skott-Knott. Os dados referentes à análise fitoquímica do óleo essencial foram submetidos à estatística multivariada, com análise de agrupamento. Os resultados demonstraram que o nitrogênio, acrescentado à solução nutritiva, promoveu um aumento do crescimento vegetativo das plantas de tomilho apenas quando a temperatura era elevada. O aumento na fitomassa promoveu um maior rendimento do óleo essencial. Durante o inverno, o teor de óleo essencial foi maior nos dois tratamentos com as maiores doses de nitrogênio. Entretanto, durante o verão, não houve diferença significativa entre os tratamentos com doses diferentes de nitrogênio e o teor de óleo. Os extratos aquosos apresentaram potencial citotóxico, pela inibição da divisão celular, e genotóxico, pela observação de irregularidades cromossômicas; e o óleo essencial mostrou atividade antiproliferativa, porém menos intensa, e, também, a atividade genotóxica pelo teste de *A. cepa*. Foi possível detectar o ácido gálico em uma amostra de extrato aquoso de tomilho, por cromatografia líquida. A cromatografia gasosa confirmou o timol como composto majoritário do óleo essencial de tomilho, nas concentrações de 45,94% e 52,41% no verão e no inverno, respectivamente.

Palavras-chave: *Allium cepa*. Cromatografia. Estações. Extrato aquoso. Óleo essencial.

ABSTRACT

PHYTOMASS PRODUCTION, PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND CYTOGENOTOXIC POTENTIAL OF THYME (*THYMUS VULGARIS* L.)

AUTHOR: Carmine Aparecida Lenz Hister
ADVISOR: Solange Bosio Tedesco

Thyme (*Thymus vulgaris* L.) has been attracting the interest of researchers for its wide use in the food and cosmetic industries, besides its use for medicinal purposes. The objective was to analyze the influence of the climatic seasons, winter and summer, and of different nitrogen concentrations, on the production of phytomass, yield and essential oil content of thyme, as well as to elucidate the chemical composition of the essential oil in both seasons, and to evaluate the potential cytotoxicity of both the aqueous extracts and the essential oil of the plants grown. The winter and summer experiments were conducted in a greenhouse from 2018 to 2020. Fresh and dry mass was evaluated to calculate phytomass production, and essential oil production was evaluated for yield and content. Liquid and gas chromatography was used to determine the chemical composition of the aqueous extracts and thyme essential oil, respectively. The Allium cepa test was employed to analyze the cytogenotoxic potential. The design used in the greenhouse experiment was entirely randomized, conducted in a factorial scheme (2X5), in two seasons of the year and five nitrogen concentrations in the nutrient solution (5, 7, 9, 11 and 13 $mmol.L^{-1}$). All data were submitted to variance analysis. The data concerning phytomass production, yield and essential oil content were analyzed by Skott-Knott and polynomial regression. The data concerning the A. cepa test were compared by the Skott-Knott test. The data concerning the phytochemical analysis of the essential oil were submitted to multivariate statistics, with cluster analysis. The results showed that nitrogen, added to the nutrient solution, promoted an increase in the vegetative growth of thyme plants only when the temperature was high. The increase in phytomass promoted a higher essential oil yield. During the winter, the essential oil content was higher in the two treatments with the highest nitrogen doses. However, during the summer, there was no significant difference between the treatments with different nitrogen doses and the oil content. The aqueous extracts showed cytotoxic potential, by inhibiting cell division, and genotoxic potential, by observing chromosomal irregularities; the essential oil showed antiproliferative activity, but less intense, and also genotoxic activity by the A. cepa test. It was possible to detect gallic acid in a sample of thyme aqueous extract by liquid chromatography. Gas chromatography confirmed thymol as the major compound in thyme essential oil, at concentrations of 45.94% and 52.41% in summer and winter, respectively.

Keywords: *Allium cepa*. Chromatography. Seasons. Aqueous extract. Essential oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Metabólitos secundários: interface entre o metabolismo primário e o ambiente externo.....31

Figura 2 – *Thymus vulgaris* L. (tomilho) cultivado em ambiente protegido no Departamento de Fitotecnia, na Universidade Federal de Santa Maria 48

Figura 3 – Extração de óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. (tomilho) por hidrodestilação em aparelho Clevenger 51

Figura 4 – Preparação dos extratos aquosos (a) e diluição do óleo essencial (b) de *Thymus vulgaris* L. (tomilho) 52

Figura 5 – Bulbos de cebola (*Allium cepa*) dispostos em copos plásticos com água destilada, aguardando a emissão de raízes.....53

Figura 6 – Pesagem de plantas de *Thymus vulgaris* L. (tomilho) frescas, logo após a colheita, e após secagem em estufa à 60ºC 60

Figura 7 – Aumento da fitomassa de plantas de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) em relação às diferentes concentrações de nitrogênio (N) na solução nutritiva e épocas de cultivo (inverno 2018 e 2019; verão 2018/19 e 2019/20) 63

Figura 8 – Rendimento do óleo essencial de plantas de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) cultivadas sob diferentes concentrações de nitrogênio (N) na solução nutritiva e épocas de cultivo (inverno e verão).....65

Figura 9 – Fases da divisão celular observadas em células meristemáticas de raízes de cebola (*Allium cepa*) tratadas com extratos aquosos de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), visualizadas em microscópio óptico 69

Figura 10 – Alterações cromossômicas visualizadas em células meristemáticas de raízes de cebola (*Allium cepa*) tratadas com óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.).....73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tratamentos utilizados na avaliação da cito e genotoxicidade dos extratos aquosos de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), pelo teste de *Allium cepa* 54

Tabela 2 - Tratamentos utilizados na avaliação da cito e genotoxicidade do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), pelo teste de *Allium cepa*.....55

Tabela 3 - Gradiente de eluição dos solventes A e B.....57

Tabela 4 - Valores médios da fitomassa fresca de plantas de *Thymus vulgaris* L. (tomilho) cultivadas sob diferentes concentrações de nitrogênio (N), nas épocas de inverno e verão, nos anos de 2018 a 2020 60

Tabela 5 - Valores médios da fitomassa seca de plantas de *Thymus vulgaris* L. (tomilho) cultivadas sob diferentes concentrações de nitrogênio (N), nas épocas de inverno e verão, nos anos de 2018 a 2020 61

Tabela 6 - Valores médios do rendimento do óleo essencial extraído a partir de plantas de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) frescas congeladas, cultivadas sob diferentes concentrações de nitrogênio (N), nas épocas de inverno e verão 64

Tabela 7 - Valores médios do teor de óleo essencial extraído a partir de plantas de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) frescas congeladas, cultivadas sob diferentes concentrações de nitrogênio (N), nas épocas de inverno e verão.....66

Tabela 8 - Valores médios do rendimento do óleo essencial (ROE) de plantas secas de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) cultivado nas épocas de inverno e verão 67

Tabela 9 - Número de células meristemáticas de *Allium cepa* (cebola) analisadas nos diferentes tratamentos com extratos aquosos de *Thymus vulgaris* L. (tomilho) e seus respectivos índices mitóticos e índices genotóxicos, incluindo células em interfase, em divisão e com alterações cromossômicas 68

Tabela 10 - Número de células meristemáticas de *Allium cepa* (cebola) analisadas nos diferentes tratamentos com óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. (tomilho) e seus respectivos índices mitóticos e índices genotóxicos, incluindo células em interfase, em divisão celular e com irregularidades.....71

Tabela 11 - Tempo de retenção (minutos), área do pico de ácido gálico e concentração de ácido gálico (mg.g-1 de extrato) em extrato aquoso de plantas secas de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) cultivadas no verão, com detecção em 250 nm 75

Tabela 12 - Composição química obtida por cromatografia gasosa do óleo essencial de plantas frescas congeladas de *Thymus vulgaris* L. (tomilho) cultivadas em estufa durante o inverno e o verão.....76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Definições de termos utilizados na medicina popular.....25

Quadro 2 – Exemplos de algumas espécies vegetais da família *Lamiaceae* amplamente utilizadas como medicinais, aromáticas e condimentares, seus nomes científicos, populares e usos tradicionais 26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.C.	Antes de Cristo
ANOVA	Análise de Variância
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPA	Boas Práticas Agrícolas
CG	Cromatografia Gasosa
CNPM	Comitê Nacional de Plantas Medicinais
ComTrade	Commodity Trade Statistics Database
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
HPLC	High performance liquid chromatography
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IM	Índice Mitótico
IG	Índice Genotóxico
ISO	International Organization for Standardization
MF	Massa Fresca
MS	Massa Seca
MT&C	Medicina Tradicional e Complementar
N	Nitrogênio
OE	Óleo Essencial
OEC	Observatory of Economic Complexity
OMS	Organização Mundial de Saúde
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RENISUS	Relação Nacional de Plantas de Interesse ao SUS
ROE	Rendimento do Óleo Essencial
STd	Soma Térmica diária
SUS	Sistema Único de Saúde
UPLC - DAD	Ultra Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14
1.1 OBJETIVOS 18
1.1.1. Geral 18
1.1.2. Específicos 18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19
2.1 PLANTAS MEDICINAIS, AROMÁTICAS E CONDIMENTARES 19
2.1.1. Histórico mundial 20
2.1.2. Histórico brasileiro 22
2.1.3. Usos 24
2.1.4. Cadeia Produtiva 27
2.2 METABOLISMO DAS PLANTAS 30
2.2.1. Óleos Voláteis ou Essenciais 32
2.3 FAMÍLIA *LAMIACEAE* 41
2.3.1. *Thymus vulgaris* L. 42
2.4 TESTES DE CITOGENOTOXICIDADE 44
2.4.1. Teste de *Allium cepa* 45
3 MATERIAIS E MÉTODOS 47
3.1 CULTIVO DE TOMILHO EM ESTUFA 47
3.2 ANÁLISE DOS MATERIAIS COLETADOS 50
3.2.1. Determinação da fitomassa 50
3.2.2. Extração do óleo essencial 50
3.2.3. Cálculo do rendimento e teor do óleo essencial 51
3.2.4. Preparo dos extratos aquosos e diluição do óleo essencial 52
3.2.5. Tratamentos e critérios de análise pelo teste de *Allium cepa* 53
3.2.6. Análise fitoquímica por cromatografia 56
3.2.6.1 Cromatografia líquida 56
3.2.6.2 Cromatografia gasosa 57
3.2.7. Análise estatística 58
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 59
4.1 DETERMINAÇÃO DA FITOMASSA 59
4.2 RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL 64
4.3 CITOGENOTOXICIDADE DOS EXTRATOS AQUOSOS 67
4.4 CITOGENOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL 71
4.5 ANÁLISE FITOQUÍMICA 74
4.5.1. Determinação dos compostos fenólicos dos extratos aquosos por UPLC-DAD 74
4.5.2. Determinação da composição química do óleo essencial por CG-EM 75
5 CONCLUSÃO 78
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 79
REFERÊNCIAS 81

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para fins medicinais é tão antiga quanto a própria história da humanidade. Através das gerações, as antigas civilizações passaram seu conhecimento empírico acumulado, o que resultou na disseminação do uso de plantas para fins curativos e, hoje em dia, desperta o interesse dos cientistas em comprovar os benefícios da medicina tradicional.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) define plantas medicinais como: “espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos” e uso tradicional como: “aquele alicerçado no longo histórico de utilização no ser humano demonstrado em documentação técnico-científica, sem evidências conhecidas ou informadas de risco à saúde do usuário” (ANVISA, 2014).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a Medicina Tradicional e Complementar (MT&C), tendo principalmente como base as plantas, contempla um amplo conjunto de práticas e cuidados com a saúde que não fazem parte do escopo da medicina convencional e não está totalmente integrada ao sistema de saúde dominante, sendo que este tipo de medicina alternativa é utilizada por cerca de 88% da população mundial (WHO, 2019). No Brasil, inexistem dados sobre o número de pessoas que fazem uso das plantas medicinais, mas, presumivelmente segue essa tendência mundial, tanto no consumo das plantas *in natura*, como em preparações de chás e, também, de fitoterápicos (CARVALHO et al. 2007).

A população de baixa renda é a principal utilizadora das plantas para fins terapêuticos, muitas vezes como única alternativa, pois não tem condições de adquirir fármacos industrializados, especialmente por seu elevado custo. Em um sistema mais humanizado, os fitoterápicos têm demonstrado serem efetivos, pois possuem características preventivas, ótimo custo-benefício e fácil divulgação nas comunidades (TOLEDO et al. 2003). Entretanto, muitas preparações que utilizam plantas medicinais ainda carecem de estudos científicos que garantam segurança de uso, uma vez que muitas plantas podem apresentar potenciais efeitos tóxicos, que, por vezes, ainda são ignorados. Além disso, os conhecimentos botânicos, agronômicos, etnofarmacológicos e químicos devem ser buscados a fim de confirmar a qualidade das plantas medicinais e seus derivados.

De um modo geral, a grande dificuldade de estudo e produção de fitoterápicos de qualidade no Brasil é que a maioria desses é obtida de plantas silvestres, sem locais definidos ou épocas de coleta (SANTOS, 2016). O cultivo de plantas medicinais para diversos fins, incluindo produção de fitoterápicos, é uma prática que deve ser aprimorada cada vez mais, sanando os problemas de qualidade. Outra medida de melhoria na cadeia produtiva de plantas para fins terapêuticos se dá posteriormente, com a colheita, a armazenagem e a rotulagem adequada.

Além do uso das plantas na prevenção e na cura de enfermidades, diversos outros usos são atribuídos às plantas e aos seus derivados, que vem despertando interesse, principalmente nas indústrias alimentícia e cosmética. Além disso, um elemento resultante do metabolismo secundário vegetal que está sendo amplamente utilizado é o óleo essencial, podendo-se citar alguns dos seus usos medicinais como: aromaterápicos, antitumorais, antidepressivos, antimicrobianos, inseticidas, acaricidas, etc. (SIMÕES e SPITZER 2004); como herbicidas, no controle alternativo de fitopatógenos e também como alelopáticos (FIORI et al., 2000; KAGALE et al., 2004; MORAIS, 2009b; MOTOYAMA et al., 2003). A busca por uma vida cada vez mais saudável, aliada ao consumismo verde e à demanda por produtos vegetais biodegradáveis, tende a aumentar cada vez mais a utilização de óleos essenciais nas mais variadas áreas.

Dentre as espécies que vêm despertando interesse no meio científico e que merece atenção está a *Thymus vulgaris* L., conhecida popularmente por tomilho. Suas folhas e ramos jovens são amplamente utilizados na culinária. No entanto, é na medicina popular que seu uso é mais difundido (LORENZI; MATOS, 2008). Usualmente, o tomilho é utilizado no tratamento de doenças respiratórias (tosse, bronquite e asma), sob a forma de chá, pomada, xarope ou por inalação de vapor (JAVED et al., 2013), e, também, tem ação antisséptica, antimicrobiana, carminativa e desinfetante (HOSSEINZADEH et al., 2015). O óleo essencial, resultante do metabolismo secundário do tomilho, é amplamente utilizado pela indústria cosmética e, também, farmacêutica, principalmente por suas propriedades antioxidantes (ASBAGHIAN et al., 2011).

A produção de plantas é bastante influenciada pelas estações do ano, assim como os metabólitos secundários, que frequentemente sofrem a influência das condições ambientais (KUTCHAN, 2001), apesar da existência de um controle

genético. Segundo destacado por Silva (2005), além da alta dependência do ambiente para a produção de óleo essencial, a época onde há maior produção de óleo pode não coincidir com a época de maior concentração de um composto químico de interesse ou ainda com a maior produção de fitomassa nas plantas. Além disso, outro fator que também pode alterar o metabolismo secundário é a disponibilidade de nutrientes. Nesse sentido, alguns macronutrientes, como nitrogênio (N), potássio (K) e fósforo (P), afetam várias rotas bioquímicas do metabolismo secundário das plantas (TAIZ, et al., 2017).

De acordo com Andriolo (1999), as estufas permitiram o ajuste do ambiente às plantas, possibilitando a extensão do período de produção para épocas e regiões antes não aptas à agricultura. Ademais, o cultivo fora do solo, utilizando substrato para sustentação das raízes e solução nutritiva para fertirrigação, segundo Martinez (2006), pode fornecer condições ótimas para o crescimento e a produção. Nesse cenário, sistemas de cultivo protegidos e fora do solo permitem planejar adequadamente a produção, tendo um maior controle no fornecimento de nutrientes e como consequência uma maior produtividade e melhor qualidade do produto final (ANDRIOLO, 2017).

As plantas da família *Lamiaceae*, a qual pertence o tomilho, possuem estruturas externas, chamadas tricomas, armazenadoras de óleo essencial (HEINZMANN et al., 2017; STICHER, 2015). Assim, deve-se levar em conta que intempéries, como o vento e o impacto de gotas de chuva podem causar perdas desse metabólito secundário (PINHEIRO, 2019). Nesse sentido, o cultivo em ambiente protegido se torna uma possibilidade para a produção de *T. vulgaris* em grande escala, uma vez que esse método reduz as adversidades climáticas, além de controlar o fornecimento de nutrientes e de água, e, ainda, manter tanto a qualidade, quanto o rendimento da produção.

Além disso, diferentes sistemas de cultivo e manejo podem alterar a qualidade das plantas medicinais e de seus componentes bioativos. Assim, a elucidação das substâncias presentes e seus potenciais efeitos (benéficos ou tóxicos) são de suma importância para que a população em geral tenha segurança na utilização de determinadas plantas medicinais. Nesse sentido, testes preliminares devem ser realizados, principalmente no tocante à toxicidade e à mutagenicidade. O uso de organismos-alvo como bioindicadores, através de métodos *in vivo*, pode

revelar possíveis efeitos danosos sobre os cromossomos. No ambiente natural, a primeira parte da planta a ser exposta a agentes tóxicos dispersos no solo e na água é a raiz, portanto, sua análise representa um método rápido para o monitoramento da toxicidade (VIEIRA e SILVEIRA, 2018).

Entre os biotestes toxicogenéticos, o teste de *Allium cepa* L. (cebola), desenvolvido por Levan (1938), é amplamente utilizado para identificar prováveis efeitos prejudiciais de inúmeras substâncias sobre as células meristemáticas de raízes de cebola. Por isso, esse bioteste é considerado ideal para uma verificação prévia de efeitos genotóxicos e antiproliferativos, por apresentar grande sensibilidade e correlação com testes que utilizam células animais (BAGATINI et al., 2007; TEDESCO e LAUGHINGHOUSE IV, 2012).

Maiores estudos são requeridos, visto que as plantas são uma fonte inesgotável de moléculas químicas, muitas desconhecidas, que podem servir de modelo para produtos químicos sintéticos, servindo como matéria-prima para produtos de baixo custo, eficazes e ambientalmente seguros. Nessa perspectiva, a produção de plantas bioativas, com controle de fatores abióticos, é importante para a geração de subprodutos vegetais padronizados, com controle de qualidade, visando a constância de componentes químicos, que atendam às mais variadas necessidades tanto dos produtores como dos consumidores (MORAIS, 2009b).

Em vista do exposto, uma das áreas mais importantes na pesquisa de plantas medicinais é a investigação das diferentes condições ambientais sobre o rendimento quantitativo e qualitativo dos óleos essenciais, cujo benefício econômico se eleva com o aumento da porcentagem de compostos bioativos desses óleos nas plantas. Diante da extensa utilização de *T. vulgaris* na medicina popular, na culinária e também na indústria, são necessários maiores estudos que busquem o preenchimento de lacunas no conhecimento sobre alguns fatores de produção, usos medicinais e toxicidade envolvendo essa importante espécie, o que evidencia a necessidade de estudos sobre o modo o qual variáveis, tais como estações climáticas (inverno e verão) e diferentes concentrações de N, influenciam a produção de fitomassa do tomilho, as concentrações de princípios ativos no óleo essencial, bem como os efeitos antiproliferativos e/ou genotóxicos do extrato aquoso e do óleo essencial.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1. Geral

Analisar a influência das estações climáticas, inverno e verão, e de diferentes concentrações de nitrogênio, sobre a produção da fitomassa, do rendimento e do teor do óleo essencial de *Thymus vulgaris*, bem como elucidar a composição química do óleo essencial nas duas estações e os efeitos genotóxicos e antiproliferativos dos extratos aquosos e do óleo essencial, pelo teste de *Allium cepa*.

1.1.2. Específicos

a) Verificar a produção de fitomassa e de óleo essencial de *T. vulgaris*, quando cultivada nas estações climáticas do inverno e do verão;

b) Avaliar a produção de fitomassa, o rendimento e o teor do óleo essencial de *T. vulgaris,* quando expostas às concentrações diferentes de N;

c) Verificar a existência de potenciais efeitos genotóxicos e antiproliferativos dos extratos aquosos e do óleo essencial de *T. vulgaris,* pelo teste *in vivo* de *Allium cepa*; e

d) Analisar a fitoquímica dos extratos aquosos e do óleo essencial de *T. vulgaris,* e verificar se há alterações quanto às estações climáticas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS, AROMÁTICAS E CONDIMENTARES

Podem ser consideradas plantas medicinais aquelas que possuem substâncias (princípios ativos), seja em suas folhas, flores, caule ou raízes, com finalidade terapêutica. As plantas ditas aromáticas são aquelas com compostos que possuem aroma, normalmente agradável, característico; e as condimentares são aquelas utilizadas como tempero, uma vez que conferem um sabor característico, e que no passado eram chamadas de especiarias e utilizadas na conservação de alimentos (CARVALHO, 2015).

A história da utilização de plantas com fins curativos remonta de tempos anteriores à escrita. Inicialmente, este conhecimento empírico acumulado, através de um processo lento de aprendizagem, porém eficaz, foi difundido oralmente através das gerações. Desde os primórdios da humanidade, as plantas também serviram como alimento e como especiarias às populações antigas.

Nos dias atuais, a utilização das plantas para fins terapêuticos e medicinais é uma prática bastante difundida pela população, principalmente por pessoas com menor poder aquisitivo, que às vezes não tem condições de comprar medicamentos industrializados, ou então em regiões de difícil acesso, onde as plantas são, na maioria das vezes, a única opção disponível para tratamento e cura de doenças. Assim, atualmente, tem se buscado novos compostos bioativos por meio da etnofarmacognosia, principalmente devido ao desenvolvimento de efeitos adversos e resistência microbiana aos fármacos sintetizados quimicamente (OUEDRAOGO et al. (2012), e, dessa forma, milhares de fitoquímicos das plantas têm sido descobertos como alternativas seguras e amplamente eficazes com menos efeitos adversos (BOLIGON e ATHAYDE, 2014), pois são mais rapidamente degradados que os compostos sintéticos, por muitos destes fitoquímicos serem sensíveis à luz solar, à umidade ou ao calor (MORAIS e MARINHO-PRADO, 2016).

Segundo Isman (2006), variadas substâncias químicas derivadas do metabolismo secundário de espécies vegetais já demonstraram efeitos defensivos, podendo ser utilizadas no manejo agrícola de pragas. O autor defende que estes inseticidas botânicos podem ser adequados para uso em sistemas de produção

orgânica e de base agroecológica, mas também na proteção pós-colheita de alimentos. Os metabólitos secundários também podem possuir funções alelopáticas, inibindo o crescimento de espécies espontâneas nas lavouras (SILVA, 2012).

Muitos compostos naturais, assim como extratos de plantas, tanto com propriedades medicinais, como também bactericidas e fungicidas, já foram descritos na literatura. Entretanto, deve-se levar em conta que os extratos de plantas são compostos por uma mistura complexa de substâncias químicas bioativas que podem fazer com que estas apresentem mais de uma finalidade.

Os testes cromatográficos, como a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) e a cromatografia gasosa (CG) são metodologias capazes de identificar e quantificar os diversos compostos químicos presentes nestas misturas complexas que são os extratos vegetais e os óleos essenciais das plantas, respectivamente.

Após a avaliação de um extrato relativamente bruto em um ensaio biológico, os produtos naturais são frequentemente isolados, a fim de caracterizar completamente suas propriedades (BOLIGON e ATHAYDE, 2014). Essas técnicas têm sido escolhidas para o estudo de *screening* ou *fingerprint* das moléculas bioativas de plantas e, também, para o controle de qualidade das plantas medicinais (FAN et al., 2006).

2.1.1. Histórico mundial

As civilizações humanas primitivas dependiam da natureza para sobreviver, fundamentalmente das plantas, das quais se alimentavam e utilizavam para recuperação de ferimentos e sintomas de problemas de saúde. Assim, ao longo das gerações, os humanos, através de observações de animais, por tentativa e erro, sucesso e fracasso, começaram a utilizar as plantas para os mais variados fins, inclusive os terapêuticos (JAMSHIDI-KIA et al., 2018). Diversas espécies de primatas já foram observadas na natureza utilizando espécies botânicas e há observações de usos de algumas das mesmas plantas que os humanos para o tratamento de doenças e ferimentos (HUFFMANN, 1997).

Além disso, as ervas aromáticas e especiarias foram largamente utilizadas na culinária desde épocas remotas. Caravanas de camelos, comuns nos séculos antes de Cristo (A.C.), levavam especiarias da Ásia para as civilizações da região do

Mediterrâneo, entre elas: canela, cravo, cardamomo, gengibre, noz-moscada e pimenta-do-reino (RAVEN et al., 2018).

Em praticamente todas as civilizações antigas há relatos do uso de plantas, principalmente as com propriedades medicinais, nas referências históricas. Os primeiros relatos escritos foram encontrados em barro de sumérios e babilônicos, com descrição de uso e aplicação de espécies vegetais ou produtos derivados como o ópio (CUNHA, 2005). Listas com nomes e aplicações de drogas vegetais foram elaboradas por chineses em 5.000 A.C. (BOFF et al., 2008). Na Índia (vale do Indo, 2.700 a 1.700 A.C.), seu sistema de medicina era baseado no uso de vegetais para o tratamento de doenças (NELLICKAPPILLY, 2010).

Já no antigo Egito, inúmeros sacerdotes foram considerados importantes por seus conhecimentos sobre incensos, resinas e mucilagens que faziam parte da mumificação (ALMEIDA, 2011). No final do século XIX, o egiptólogo alemão Georg Ebers, teve acesso a um papiro encontrado em um túmulo junto a uma múmia, datado de aproximadamente 1500 A.C. Após sua tradução, ele ficou conhecido como '*Papiro de Ebers*', e é o primeiro tratado médico conhecido, pois contém a descrição de espécies vegetais e produtos fármaco-terápicos, como mirra, babosa, sândalo e papoula (ALMEIDA, 2011).

Da Grécia antiga surgiram os mais importantes conceitos médicos e contribuições ao uso de plantas bioativas cunhados por Hipócrates (460-370 A.C.), Galeno (129-199 A.C.) e Dioscórides (40-90 D.C.). A publicação de Dioscórides '*De Materia Medica*' garantiu o seu reconhecimento como fundador da Farmacognosia (ROCHA et al., 2015). A medicina grega foi traduzida para o latim pelos árabes e islâmicos, estes por sua vez enriqueceram o conhecimento e incluíram espécies botânicas importantes que se espalharam pela Europa no final da Idade Média (SAAD, 2014).

Na Europa Medieval do Século XV, os mosteiros e conventos centralizaram estes conhecimentos médicos, principalmente a Ordem Beneditina (MEDEIROS, 2009), e ampliaram os conhecimentos passando a compreender as plantas medicinais, por causa de suas propriedades medicinais inerentes, como fontes curativas (CUNHA, 2005). Com as grandes navegações e a descoberta de novos continentes, um grande acervo terapêutico de origem vegetal foi levado ao "novo mundo". (PINTO et al., 2002).

De acordo com Brandão (2017), os povos tradicionais americanos pré-colombianos também utilizavam as plantas, como alimento ou remédio, há mais de dez mil anos como já foi demonstrado por registros arqueológicos do uso pelos ameríndios de mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.), cacau (*Theobroma cacao* L.), abacate (*Persea americana* Mill.), batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) e milho (*Zea mays* L.).

2.1.2. Histórico brasileiro

Antes do período colonial, as comunidades indígenas nativas no Brasil já apresentavam práticas de saúde próprias baseadas na medicina tradicional, se beneficiando das espécies vegetais bioativas (WALKER, 2013). Pedro Álvares Cabral quando aqui desembarcou, observou o uso de produtos de origem vegetal para alimentação, tratamento de doenças, rituais e finalidades cosméticas entre os povos indígenas nativos (ROCHA et al., 2015). Mais tarde também houve a contribuição dos povos africanos que trouxeram consigo algumas espécies vegetais e sua tradição de uso de plantas medicinais (ALMEIDA, 2011).

No princípio, os portugueses apropriaram-se do conhecimento indígena e o adaptaram, unindo-o à alquimia europeia para satisfazer suas necessidades alimentares e de cura de enfermidades. Os missionários portugueses, principalmente jesuítas, começaram a comercializar em escala mundial os medicamentos derivados das espécies da flora brasileira, sendo empregados em grande escala na Europa durante os séculos XVI, XVII e XVIII (WALKER, 2013).

Após a chegada da família real portuguesa aqui no Brasil, 1808, diversos naturalistas estrangeiros tiveram finalmente permissão para entrar no Brasil. As práticas indígenas foram retratadas por Karl Von Martius, em 1844, na obra '*Natureza, doenças, medicina e remédios dos índios brasileiros*' (FREITAS, 2014). Além disso, os diversos naturalistas europeus contribuíram fortemente para o conhecimento da biodiversidade vegetal brasileira, visto que diversos novos gêneros foram descritos e centenas de novas espécies foram descobertas, representando uma relevante fonte de informação sobre as plantas bioativas do Brasil (BRANDÃO, 2017).

Além disso, quando as fontes de especiarias, Índia e Ásia, começaram a passar para os ingleses e holandeses, Portugal iniciou no Brasil a corrida às especiarias do sertão – cravo, canela, baunilha, raízes aromáticas, urucum, anil, sementes oleaginosas, entre outras (PINTO et al., 2002). Toda esta corrida exploratória por especiarias trouxe consequências como vários danos ao ambiente, principalmente pelo extrativismo desenfreado e a destruição de habitats naturais e escassez dessas matérias-primas. Entretanto, os hábitos culturais do Brasil colônia sempre foram vistos como arcaicos, em comparação com os conhecimentos já reconhecidos cientificamente vindos da Europa, e, assim, com o passar do tempo, houve uma imposição dos hábitos culturais dos exploradores e a desqualificação do conhecimento tradicional, fazendo com que aos poucos o conhecimento indígena e dos africanos fosse deixado de lado, ficando o hábito cultural das plantas medicinais restrito às comunidades mais isoladas (ROCHA et al., 2015).

Mais recentemente, novas ondas migratórias, principalmente de orientais e europeus, trouxeram outras heranças relacionadas à medicina popular, principalmente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. Plantas que foram trazidas por estes imigrantes se adaptaram ao nosso clima, e difundiram-se na culinária e na medicina popular, como: erva-cidreira (*Melissa officinalis* L.), erva-doce (*Foeniculum vulgare* Mill.), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), louro (*Laurus nobilis* L.), gengibre (*Zingiber officinallis* Roscoe), canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume), raiz forte (*Wassabia japonica* (Miq.) Matsum), entre outros (ALMEIDA, 2011).

No início do século XX, com a crescente industrialização, urbanização e o advento da indústria farmacêutica, houve uma desvalorização da medicina popular por uma suposta ineficácia, sendo esta substituída pelos medicamentos sintéticos cujo uso se tornou mais comum (BRUNNING et al., 2012). Desta maneira, a população diminuiu o uso de espécies vegetais bioativas.

No final da década de 70, ocorreu o surgimento dos chamados movimentos de contracultura que começaram a questionar o modelo de sociedade consumista bem como a poluição e a elevada destruição ambiental (FIGUEIREDO, 2018), reivindicando que as práticas de medicina tradicionais voltassem a fazer parte dos sistemas de saúde do governo (CASTRO e FIGUEIREDO, 2019). Assim, ocorreu uma revalorização das práticas terapêuticas da medicina tradicional.

Em 2002, a OMS publicou objetivos e as diretrizes para que os países membros iniciassem o processo de inserção ou expansão da medicina tradicional em suas práticas governamentais de saúde (WHO, 2002). Além disso, orientou que cada país criasse um conjunto de regras para nortear a produção e avaliação da qualidade dos produtos medicinais, denominado de Farmacopeia.

Nos últimos anos foram publicados, no Brasil, vários documentos que dispõem sobre plantas medicinais e têm promovido o uso racional e seguro destas, como: a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS, criada por meio da Portaria n° 971/2006 (BRASIL, 2006a); a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos - PNPMF, através do Decreto n° 5.813/2006 (BRASIL, 2006b); a Portaria nº 2.960/2008 aprovou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e criou o Comitê Nacional de Plantas Medicinais (CNPM) e Fitoterápicos (BRASIL, 2008).

Um outro marco importante foi a publicação da Relação Nacional de Plantas de Interesse ao SUS (RENISUS) (BRASIL, 2009), contendo uma lista de 71 espécies vegetais, nativas e exóticas, com potencial terapêutico, objetivando influenciar as pesquisas científicas com plantas medicinais e estimular a cadeia produtiva no Brasil. Na Resolução RDC nº 10 (ANVISA, 2010) constam 66 espécies de plantas indicadas pelo conhecimento tradicional para uso em doenças de baixa gravidade, cujo uso pode ser realizado sem o respaldo médico. Através da Portaria nº 702 (BRASIL, 2018), o Ministério da Saúde incluiu a aromaterapia na PNPIC.

Desde então, a Anvisa publicou várias normas e mantém a regulamentação e atualização em relação às plantas medicinais, que possuem aplicações em diversos campos, como: insumos, alimentos, cosméticos e fitoterápicos.

2.1.3. Usos

O uso popular das plantas com propriedades bioativas se dá através de um conhecimento empírico, passado de geração em geração. A população faz uso das plantas em forma de chás ou extratos aquosos, na alimentação, como especiarias e temperos. Neste sentido, Resolução n° 26 da Anvisa (2014) apresenta algumas definições importantes, discriminadas no Quadro 1, a seguir:

Quadro 1 - Definições de termos utilizados na medicina popular

Termo	Definição
Chá medicinal	Droga vegetal com fins medicinais a ser preparada por meio de infusão, decocção ou maceração em água.
Droga vegetal	Planta medicinal, ou suas partes, que contenham as substâncias responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta e secagem, quando aplicável, podendo estar na forma íntegra, triturada ou pulverizada.
Decocção	Preparação que consiste na ebulição da droga vegetal em água potável por tempo determinado. Método indicado para partes de drogas vegetais com consistência rígida, tais como cascas, raízes, rizomas, caules, sementes e folhas coriáceas ou que contenham substâncias de interesse com baixa solubilidade em água.
Infusão	Preparação que consiste em verter água potável fervente sobre a droga vegetal e, em seguida, abafar o recipiente por um período de tempo determinado. Método indicado para partes de drogas vegetais de consistência menos rígida, tais como folhas, flores, inflorescências e frutos, ou com substâncias ativas voláteis ou ainda com boa solubilidade em água.
Maceração com água	Preparação que consiste no contato da droga vegetal com água potável, a temperatura ambiente, por tempo determinado, específico para cada droga vegetal. Método indicado para drogas vegetais que possuam substâncias que se degradem com o aquecimento.
Planta medicinal	Espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos.
Uso tradicional	Aquele alicerçado no longo histórico de utilização no ser humano demonstrado em documentação técnico-científica, sem evidências conhecidas ou informadas de risco à saúde do usuário.

Fonte: Adaptação de Resolução n° 26 da Anvisa (2014).

Uma pesquisa simples pode gerar diversos artigos científicos enumerando as diferentes espécies vegetais comumente utilizadas na medicina tradicional em diversas localidades, tanto em nível nacional como também mundial. Nesse sentido, surgiram as chamadas monografias sobre plantas medicinais, as quais começaram a ser publicadas na década de 1980, visavam agrupar e padronizar o conhecimento das plantas medicinais em relação as suas características e propriedades, para auxiliar tanto médicos como a população em geral (VEIGA JÚNIOR; MELLO, 2008). Por outro lado, segundo os mesmos autores, as farmacopeias se caracterizam por estabelecer padrões de qualidade que os medicamentos devem apresentar. E dentro das farmacopeias, que estão em constante atualização, encontram-se as monografias de espécies vegetais medicinais.

A Família *Lamiaceae*, a qual pertence o tomilho, é uma família rica em espécies medicinais, aromáticas e condimentares. No Quadro 2 são listados alguns exemplos de espécies vegetais bioativas dessa família e seus usos tradicionais.

Quadro 2 – Exemplos de algumas espécies vegetais da família *Lamiaceae* amplamente utilizadas como medicinais, aromáticas e condimentares, seus nomes científicos, populares e usos tradicionais

Nome científico	**Nome popular**	**Uso tradicional**
Lavandula angustifolia Mill.	Lavanda	digestivo, antiespasmódico, calmante, antimicrobiano, tratamento das afecções das vias respiratórias
Melissa officinalis L.	Melissa	antiespasmódico, ansiolítico, sedativo leve
Mentha pulegium L.	Poejo	antisséptico, antigripal
Ocimun basilicum L.	Manjericão	tempero, digestivo, vermífugo
Origanum vulgare L.	Orégano	tempero, analgésico, expectorante
Plectranthus barbatus Andrews	Falso-Boldo	tratamento de gastrite, dispepsia, azia, mal estar gástrico
Rosmarinus officinalis L.	Alecrim	tempero, antisséptico, antiespasmódico
Salvia officinalis L.	Sálvia	tempero, ansiolítico, digestivo, para tratar problemas de menopausa
Thymus vulgaris L.	Tomilho	tempero, antisséptico, antiespasmódico

Fonte: Adaptação de Lorenzi e Matos (2008) e Melo (2016).

O uso de preparações caseiras de plantas com uso tópico também é bem conhecido, como, por exemplo, os fitocosméticos elaborados com óleos, gorduras vegetais, extratos e tinturas, no intuito de melhorar as condições da pele (Silva, 2016). O mesmo autor cita como exemplo o uso de alecrim no tratamento da queda de cabelo e acne. Patil et al. (2021) relata o uso de tomilho para tratar acne, dermatite e picada de insetos.

Além desses usos tradicionais, há estudos relatando os potenciais dos extratos vegetais contra células cancerígenas. Wang et al. (2014) mostraram que extratos aquosos de sementes de jabuticaba exibem um efeito antiproliferativo contra as células cancerígenas orais, induzindo a apoptose. Por outro lado, efeitos protetores contra distúrbios celulares e genéticos foram demonstrados por extrato da casca de jabuticaba, onde a pré-incubação com o extrato impediu alterações induzidas pelo cobre no índice mitótico de células de *A. cepa*, reduzindo o número de células anormais (FRANSCESCON et al., 2018)

A crescente busca por produtos naturais – derivados de plantas medicinais, aromáticas e condimentares – está, inclusive, despertando o interesse de pesquisadores que estão buscando a comprovação dos benefícios das plantas e seus derivados. Considerando que a humanidade, ao longo de milhares de anos, apenas selecionou cerca de 300 plantas para a alimentação e obteve princípios ativos para o tratamento de doenças de mais ou menos 100 plantas (PINTO et al., 2002), há um leque muito amplo de estudos para aumentar este modesto número

diante da biodiversidade de espécies de plantas existentes. Entretanto, uma grande preocupação neste sentido é a extinção de espécies com substâncias bioativas potencialmente importantes, principalmente pela destruição de *hábitats* e pela contaminação por agrotóxicos, havendo uma necessidade de investimento em estudos etnobotânicos e de agroecologia (HECK e MARCHI, 2017).

Apesar do grande aumento de pesquisas no campo das plantas medicinais, aromáticas e condimentares, devido à enorme burocracia imposta pela Anvisa para o registro de plantas e derivados para uso com fins terapêuticos, pois essas são tratadas como medicamentos sintéticos, ainda reinam os estudos farmacológicos pré-clínicos e de ensaios clínicos para provar a eficácia e segurança das plantas medicinais. Por outro lado, segundo Calixto (2005), outros campos emergem desse progresso no uso de plantas medicinais, dando ênfase na domesticação, na produção em larga escala e nas melhorias genéticas nas plantas bioativas.

2.1.4. Cadeia Produtiva

No Brasil, ainda é grande o extrativismo de plantas bioativas, o que representa um problema em relação à perda de biodiversidade e extinção de espécies endêmicas, a inconstância na qualidade das plantas devido à influência dos fatores extrínsecos, bem como a identificação errônea de plantas, que pode ter resultados fatais (CARVALHO et al., 2010). Por outro lado, a megadiversidade de plantas do Brasil faz com que esse seja considerado um potencial centro de produção de espécies de plantas aromáticas, condimentares e medicinais, apesar de possuir um grande grupo de espécies exóticas já adaptadas, como é o caso de tomilho.

A cadeia produtiva de plantas bioativas apresenta muitas oportunidades, principalmente para agricultores familiares, pois se estende desde a produção até o empacotamento, a extração de óleo essencial e a comercialização para indústrias de alimentos e bebidas, cosméticos, fitoterápicos, fitofármacos, corantes, produtos artesanais, repelentes de insetos ou de uso agrícola (SENAR, 2017). A pouca exploração deste nicho de produção de plantas bioativas aromáticas, condimentares e medicinais, em parte, se explica pela grande complexidade da cadeia produtiva, pois se tratam de muitas espécies vegetais, entre nativas e exóticas, além de vários

mercados que são abastecidos por estas plantas. Além disso, há diferentes formas de comercialização: plantas frescas ou secas, extratos vegetais e óleos essenciais (BLANCO e SILVA, 2013).

No Brasil, não há uma cadeia produtiva de espécies aromáticas e medicinais, há apenas experiências pontuais, como no caso do estado do Paraná. Nesse estado, há registros de cultivo de plantas medicinais com longa tradição, que foi introduzido por imigrantes europeus e que as cultivam há 40 anos, tendo, hoje, um valor econômico e social expressivo, e uma grande importância como alternativa de renda (CORRÊA JÚNIOR e SCHEFFER, 2014).

Embora não se consiga controlar todos os fatores abióticos que possam ter um impacto nas plantações de plantas aromáticas, condimentares e medicinais, a utilização de estufas pode minorar os efeitos negativos que podem diminuir a qualidade e ainda permite manter uma constância ao longo dos anos, característica muito importante para manter as propriedades terapêuticas. A aplicação de adubos nitrogenados também é uma estratégia para melhorar o crescimento vegetativo das plantas. A utilização de nitrogênio aumentou a altura de plantas de *Aloe indica* Royle = *Aloe vera* (HOSSAIN et al., 2007) e *Ocimum basilicum* L. (KANDIL et al., 2009), a produção de *Thymus serphyllum* L. (PAL et al., 2016) e, também, aumentou o teor de óleo essencial da semente de *Foeniculum vulgare* Mill. (EHSANIPOUR et al., 2012).

São poucas as informações disponíveis, do ponto de vista agronômico, do tomilho e de outras plantas medicinais, aromáticas e condimentares no Rio Grande do Sul. As técnicas para o aumento da produção de fitomassa de plantas bioativas deve sempre levar em consideração a manutenção do valor terapêutico da espécie. Neste contexto, o primeiro passo é o planejamento, que envolve, inicialmente, o conhecimento do comportamento da espécie que se deseja cultivar. A eleição dos melhores locais e épocas de cultivo são essenciais para manejar a produção de modo a aumentar a fitomassa e o rendimento de substâncias bioativas. Os fatores ambientais que mais influenciam o crescimento e o desenvolvimento das plantas são a temperatura, o fotoperíodo e a radiação, além de disponibilidade de umidade e qualidade da nutrição (MARCHESE e FIGUEIRA, 2005).

Segundo o manual de Boas Práticas Agrícolas (BPA) de plantas medicinais, aromáticas e condimentares (CORRÊA JUNIOR e SCHEFFER, 2013), o plantio em

conjunto destas plantas, em uma espécie de consórcio, diminui o risco de aparecimento de plantas daninhas e doenças, e ao mesmo tempo melhora a produção de espécies que são potencialmente companheiras, porém, é preciso ter cuidado com os efeitos alelopáticos que muitas plantas apresentam. Também se deve atentar à questão de que o manejo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares contra insetos e herbívoros, deve ser diferente, assim, os próprios extratos vegetais e óleos essenciais podem servir como uma opção de bioherbicidas (COSTA et al., 2004)

De modo geral, quando os princípios ativos se encontram na massa verde das plantas (folhas e ramos), como é o caso do tomilho, há a recomendação da colheita antes do florescimento, pois neste estágio os princípios ativos estariam mais concentrados nas folhas (CARVALHO, 2015). Após a colheita é necessário fazer o correto armazenamento do material, para evitar perdas. Os propósitos de uso – chá, tempero, aromatizador, extração de óleos essenciais – determinam quais as melhores técnicas de preservação.

Se o propósito de venda for para consumo, como tempero ou chá, pode-se fazer a secagem do material. A secagem, que deve ser iniciada após a colheita, tem como objetivo desidratar a planta visando conservá-la por mais tempo. A menor quantidade de água no interior das células evita o ataque de enzimas, diminuindo, assim, a perda de seus princípios bioativos (ALMEIDA, 2011). Há várias metodologias de secagem, cuja eficiência varia de acordo com a espécie – tempo e temperatura – e com a parte utilizada – raiz, casca, folhas, flores – sempre buscando a manutenção da qualidade e quantidade dos componentes responsáveis pelos efeitos terapêuticos, assim como manutenção da cor, aroma e sabor característicos. No caso do tomilho, há estudos realizados por Rocha et al. (2012), que recomendam a secagem das folhas de tomilho com o ar a 60ºC, pois nessa temperatura os valores dos constituintes do óleo essencial não sofreram grandes reduções em relação aos encontrados na planta *in natura*.

As plantas depois de secas devem ser rotuladas e guardadas em local seguro (inacessível a qualquer animal ou insetos), livre de umidade e de temperatura amena. Após a armazenagem, de acordo com o propósito de uso, é preciso fazer sua comercialização (CORRÊA JUNIOR e SCHEFFER, 2013).

A comercialização de espécies medicinais, aromáticas e condimentares pode ser uma fonte de renda extra para pequenos agricultores (ROSA e GIACOMELLI, 2014). Esses, quando cultivam em pequenas áreas e viveiros, podem fazer uma distribuição direta em feiras de produtos naturais, restaurantes ou farmácias de manipulação; ou, então, em áreas maiores, produzindo para a venda em grandes empresas, que podem revender os derivados vegetais em forma de condimentos ou para extratoras de óleos essenciais. Também há a possibilidade de se fazer alguma forma de beneficiamento, na forma de extratos, tinturas e óleos, para aumentar o valor agregado do produto.

Apesar da grande utilização de plantas aromáticas, condimentares e medicinais pela população mundial, esse mercado no Brasil ainda é irrisório. De acordo com Observatory of Economic Complexity (OEC), em 2017, o Brasil exportou $14,1 milhões de dólares de material vegetal (fresco ou seco) utilizado para perfumaria, farmácia e para fins inseticidas, o que equivale a apenas 0,52% das exportações mundiais.

2.2 METABOLISMO DAS PLANTAS

O metabolismo primário ou basal, comum a todas as espécies vegetais, é essencial ao crescimento e ao desenvolvimento das plantas (fotossíntese, respiração, síntese de proteínas, etc.). No entanto, as plantas, para compensar sua imobilidade, desenvolveram diversos mecanismos para a sua interação com outras plantas e com o meio ambiente, o que inclui a liberação de compostos voláteis através de folhas, flores, frutos e raízes (DUDAREVA et al., 2006). Esses compostos voláteis são resultado do metabolismo secundário, os quais não possuem ligação direta com as funções essenciais à vida, mas auxiliam na sobrevivência das plantas, e são exclusivos de algumas espécies (TAIZ et al.; 2017).

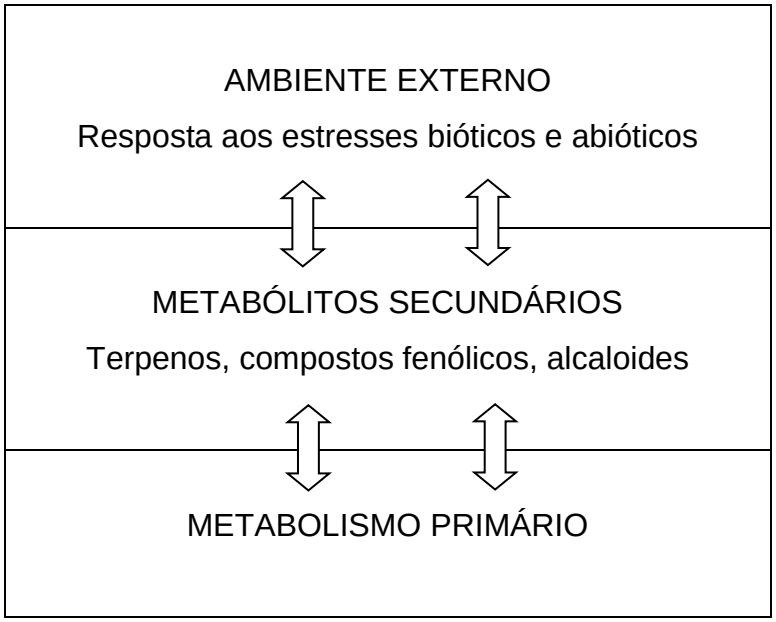
O metabolismo secundário é responsável pela produção de substâncias de uma grande gama de diferentes moléculas orgânicas. A nutracêutica, ou seja, a busca pelos chamados alimentos funcionais, está ligada ao metabolismo secundário e tem se tornado bastante relevante nos últimos anos, e combina a alimentação com a prevenção de doenças. Isto está associado aos antioxidantes (exemplo, flavonoides e carotenoides), que são derivados do metabolismo secundário e que

são grande parte das substâncias de origem vegetal que previnem doenças (PERES, 2004).

Na planta, a produção de metabólitos secundários é inconstante e desuniforme, podendo ocorrer em certo estágio de desenvolvimento, em órgãos/tecidos específicos, e, normalmente, esses possuem uma composição química bastante complexa (RAVEN et al., 2018). Além disso, a quantidade e a qualidade de metabólitos secundários produzidos podem variar sob diferentes condições de sazonalidade, ciclo circadiano, fase de desenvolvimento da planta, altitude, composição da atmosfera, temperatura, radiação ultravioleta, disponibilidade de água e nutrientes no solo (GOBBO-NETO; LOPES, 2007) e cada espécie comporta-se de maneira diferente frente a esses fatores (HEINZMANN et al., 2017).

Conforme a Figura 1, os metabólitos secundários encontram-se na interface entre o metabolismo primário e o ambiente externo, cujas rotas metabólicas são ativadas de acordo com a interferência dos fatores extrínsecos. Assim, os metabólitos secundários apresentam uma grande importância na modulação da resposta aos fatores abióticos, bem como na defesa das plantas contra herbivoria e patógenos, e, também, auxiliam na atração de polinizadores (TAIZ et al., 2017).

Figura 1 – Metabólitos secundários: interface entre o metabolismo primário e o ambiente externo



Fonte: Adaptação de Taiz et al. (2017).

Diversos metabólitos secundários apresentam características únicas (sabor, cor e aroma) que as transferem para nossos alimentos, enquanto outros têm uma aplicação comercial nas áreas farmacêutica, cosmética, biomédica e agronômica, fazendo parte da composição de medicamentos, corantes, fragrâncias, bactericidas, inseticidas e fungicidas (VERPOORTE et al., 2002). As substâncias químicas presentes nesses metabólitos secundários, chamadas de princípios ativos, podem ser utilizadas como recurso terapêutico na medicina tradicional. Entretanto, deve-se levar em conta que algumas dessas substâncias, dependendo da quantidade utilizada, podem ou não apresentar efeitos tóxicos, isto é, causar efeitos danosos ao organismo ao invés de benefícios.

Os metabólitos secundários, com base nas suas origens biossintéticas, pertencem às seguintes classes de moléculas: terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos), compostos nitrogenados (alcaloides) e compostos fenólicos (CASTRO et al., 2004).

Os extratos vegetais são misturas complexas de vários compostos bioativos derivados do metabolismo secundário. Esta variedade de distintas substâncias se deve ao fato de as plantas, durante a evolução, desenvolverem metabólitos com funções diferentes. Desta maneira, as plantas estavam mais protegidas contra doenças e pragas, e minimizava o surgimento de resistência em seus inimigos naturais (PERES, 2004).

Em vista disso, substâncias derivadas do metabolismo secundário, cuja função é a defesa através da citotoxicidade sobre patógenos, podem servir como antimicrobianos na medicina (PERES, 2004). Por outro lado, aquelas substâncias com ação neurotóxica sobre herbívoros, podem serem usadas em humanos como sedativos, antidepressivos e até anestésicos (BRISKIN, 2000).

A Anvisa (2014) define estes metabólitos como produtos derivados de vegetais: “Derivado vegetal = produto da extração da planta medicinal fresca ou da droga vegetal, que contenha as substâncias responsáveis pela ação terapêutica, podendo ocorrer na forma de extrato, óleo fixo e volátil, cera, exsudato e outros”.

2.2.1. Óleos Voláteis ou Essenciais

Óleos voláteis ou essenciais são produtos naturais e complexos derivados do metabolismo secundário das plantas (HEINZMANN et al., 2017). Segundo Taiz et al. (2017), eles são produzidos em diferentes concentrações e presumivelmente atuam na defesa contra herbívoros, vírus, fungos, bactérias, entre outros, além de atuarem na atração de polinizadores.

Plantas que possuem óleos essenciais (OE) normalmente apresentam estruturas específicas onde esses óleos ficam armazenados e de lá são excretados. Por exemplo, há estruturas secretoras de óleo nas famílias *Piperaceae* e *Lauraceae*. Espécies das famílias *Rutaceae*, *Apiaceae* e *Myrtaceae* apresentam estruturas intracelulares de depósito. Os OEs também podem ser armazenados em tricomas ou escamas glandulares, estruturas localizadas entre a cutícula e a membrana celular, como nas famílias *Asteraceae* e *Lamiaceae* (HEINZMANN et al., 2017; STICHER, 2015).

Os OE são líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente, possuem aroma agradável e intenso, são solúveis em solventes orgânicos apolares (éter, etanol e clorofórmio) e apresentam solubilidade limitada em água, porém, suficiente para aromatizar hidrolatos (soluções aquosas com OE) (HEINZMANN et al., 2017). Além disso, os OE são produtos derivados de espécies vegetais obtidos por processos de destilação – hidrodestilação, destilação de arraste de vapor, destilação a seco – ou por processo mecânico como prensagem. Diferentemente dos extratos vegetais, que são produtos líquidos obtidos de partes de plantas.

Alguns OE são tranquilizantes, como os óleos de lavanda (*Lavandula angustifolia* L.) e de melissa (*Melissa officinalis* L.), já outros possuem efeito estimulante, como o óleo de canforeira [*Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl.] (HEINZMANN et al., 2017). Além dessas funções, os OEs dão sabor característicos às espécies.

Um mercado em ampla expansão é o setor de cosmética e perfumaria, com produtos elaborados à base de OE, sempre em busca de novidades e novos aromas. Nesse sentido, as plantas aromáticas representam, um grande potencial de pesquisa. Além da cosmética e perfumaria, há perspectivas de uso em produtos de higiene e limpeza, e ainda com bioatividade para controle de pragas da agricultura e da pecuária (VIEIRA et al., 2016).

De uma forma geral, os OE são compostos principalmente por terpenos ou seus derivados. Monoterpenoides (compostos por 10 carbonos) e sesquiterpenoides (15 carbonos), devido ao seu baixo peso molecular, constituem-se de substâncias voláteis presentes nos óleos obtidos por processos de destilação, enquanto diterpenoides (20 carbonos), ocorrem em óleos obtidos por extração com solventes e por fluido supercrítico (HEINZMANN et al., 2017; STICHER, 2015). Como uma das funções dos OE é evitar danos causados por agentes externos nas plantas, a atividade antimicrobiana é uma das funções reconhecidas dos terpenos (FELIPE & BICAS, 2017).

As misturas naturais complexas que configuram os OE podem conter de 20 a 80 compostos químicos (REGNAULT-ROGER et al., 2012), em concentrações bastante variadas, sendo que dois ou três são componentes majoritários em concentrações razoavelmente altas (de 20 a 70%), em comparação com outros componentes presentes em pequenas quantidades (BAKKALI et al., 2008).

Os OE produzidos predominantemente para as indústrias, alimentícia, farmacêutica, de higiene, etc., são: laranja, menta, eucalipto, citronela, hortelã e limão (SIVROPOULOU et al., 1996; BARBIERI; BORSOTTO, 2018). Os óleos geralmente usados para fins domésticos e aromaterápicos incluem: lavanda, camomila, hortelã, melaleuca, eucalipto, gerânio, jasmim, rosa, limão, laranja e alecrim (BARBIERI; BORSOTTO, 2018).

2.2.1.1. Fatores que influenciam a quantidade e a qualidade dos óleos essenciais

A partir de diferentes órgãos de uma mesma planta pode-se obter OE com composição química, características físico-químicas e odores bem distintos. Cabe ressaltar, ainda, que a composição química de um óleo volátil pode variar significativamente, mesmo sendo extraído do mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, de acordo com condições climáticas e de solo (HEINZMANN et al., 2017).

De acordo com Gobbo-Neto e Lopes (2007), os constituintes ativos dos OE não são constantes durante o ano, variando sazonalmente. Em algumas espécies, a produção de OE se concentra na floração (SIMÕES; SPITZER, 2004). Normalmente, o teor de OE é maior quando as plantas são expostas à temperatura elevada,

entretanto, em dias muito quentes, pode ocorrer a perda significativa destes óleos pela transpiração, ou outras rotas metabólicas, uma vez que eles são voláteis (MORAIS, 2009b). Em estudo com o tomilho, foi demonstrado que o desenvolvimento de tricomas, onde os OE são armazenados, depende da luz (YAMAMURA et al., 1989).

Para os produtores de plantas ricas em OE, é importante obter quantidades suficientes de biomassa de boa qualidade, com alto teor de OE. Apesar do controle de alguns fatores extrínsecos ser limitado, é possível minimizar os impactos negativos sobre o rendimento de OE através do manejo da plantação (THOMPSON et al., 2003).

A disponibilidade de nutrientes é um dos fatores que influencia, de forma positiva ou negativa, a produção de fitomassa e de substâncias ativas, como o OE, visto que os nutrientes são indispensáveis para o metabolismo vegetal (MORAIS, 2009a). O nitrogênio (N) é assimilado pelas plantas por diversas vias bioquímicas sendo constituinte de compostos orgânicos, principalmente de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos (TAIZ et al., 2013). Sendo o N um dos nutrientes exigidos em maior quantidade pelas plantas (AGREN; FRANKLIN, 2003), modificações na sua disponibilidade podem alterar a produção de metabólitos secundários (CASTRO et al., 2004).

A literatura demonstra uma relação linear entre o crescimento foliar e a disponibilidade de N (AÊGREN; FRANKLIN, 2003). Sabendo-se que o N estimula o crescimento vegetativo (muita produção de folhas) em detrimento da formação de estruturas reprodutivas (SCHWAMBACH; CARDOSO SOBRINHO, 2014), pode-se oferecer maior ou menor quantidade deste nutriente para as plantas, dependendo do seu objetivo de produção. Em várias espécies de plantas os OE se concentram em hastes, caules e folhas, neste caso a disponibilidade maior de N irá estimular o crescimento vegetativo. Por outro lado, em plantas onde as flores (estruturas reprodutivas) são os órgãos com maior quantidade de óleos essenciais, o N não é tão importante.

Em experimento realizado com camomila (*Chamomila recutita* (L.) Rauschert), doses elevadas de N ocasionaram um maior desenvolvimento e rendimento do óleo volátil das plantas (AMARAL et al., 2008). Deschamps et al. (2012), comparando a produção de *Mentha x piperita* L. com diferentes doses de N no solo (20, 30 e 40

Kg.ha^{-1}), observaram que houve aumento da fitomassa e do rendimento do OE nas duas maiores doses de N.

Por outro lado, em estudo de Costa et al. (2010), a menor dose de N (30 Kg.ha^{-1}) foi suficiente para o maior crescimento e rendimento de OE de *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth, se comparado com as maiores doses (60, 90 e 120 Kg.ha^{-1}). Em estudo realizado por Frescura (2014), com alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) cultivado em estufa, com uso de fertirrigação, a maior produção de fitomassa e rendimento do OE se deu em uma dose de N intermediária (9,4 mmol.L^{-1}).

Ainda em relação ao rendimento do OE, cada espécie tem suas particularidades, sendo que algumas têm maior rendimento quando o óleo é extraído de material fresco e outras de material seco. A secagem do orégano (*Origanum vulgare* L.), em temperatura ambiente, resulta em uma redução do rendimento do óleo (JERKOVIĆ et al., 2001), assim como em calêndula (*Calendula officinalis* L.) (OKOH et al., 2008). Soares et al. (2007) obtiveram maior rendimento de OE em manjericão (*O. basilicum*) seco à 40°C, porém, o maior teor de linalol, um dos seus principais constituintes, foi obtido com secagem em temperaturas mais elevadas (50 e 60 °C).

Além da quantidade, deve se ter em mente a qualidade do OE extraído, cujos compostos majoritários podem sofrer alterações em algumas espécies dependendo de fatores ambientais, de coleta, de armazenamento, de extração, etc. Sobre o tomilho, segundo Usai et al. (2011), o congelamento foi o melhor método para manter a composição do OE, mostrando, também, a melhor retenção de timol.

Em muitas espécies, a composição e o rendimento do óleo essencial/volátil também poderão mudar conforme a época do ano. No geral, a melhor época de colheita é específica de cada espécie e deverá ser determinado de acordo com a composição e o rendimento de óleo mais adequado, a partir de um ponto de vista comercial, agronômico ou medicinal. Nesse sentido, para obtenção de OE de composição constante, eles devem ser extraídos do mesmo órgão das plantas cultivadas no mesmo solo, nas mesmas condições, no mesmo clima e que são colhidas na mesma estação (BAKKALI et al., 2008).

A análise de OE por cromatografia gasosa (CG), é uma metodologia eficiente, que busca qualificar e quantificar os diversos compostos químicos presentes nestas misturas complexas. Diversos autores já utilizaram essa metodologia para a fazer a

caracterização química de OE: Deschamps et al. (2012), Amaral et al. (2014), Amaral et al. (2015), Satyal et al., (2016), Askary et al. (2018), entre outros.

2.2.1.2. Usos

Os óleos essenciais são complexos e multifuncionais. São compostos por numerosas moléculas, que possuem diversas propriedades farmacológicas. Nessa lógica, há dúvidas sobre o que pode ser responsável por estes efeitos: o sinergismo de todas as moléculas presentes no óleo ou apenas os compostos majoritários? Segundo Ipek et al. (2005), os principais compostos refletem as características biológicas dos OE dos quais foram isolados, sendo a amplitude de seus efeitos dependente apenas da concentração quando testados sozinhos ou compreendidos em óleos com os demais constituintes. Também deve-se ter cuidado e distinguir os efeitos terapêuticos de uma espécie vegetal rica em OE, com os efeitos do óleo isolado dela.

Alguns usos medicinais dos OE podem ser citados: aromaterápicos, antitumorais, antidepressivos, antimicrobianos, inseticidas, acaricidas, etc. (SIMÕES; SPITZER 2004), também há estudos que demonstram atividade contra fitopatógenos (FIORI et al., 2000; MOTOYAMA et al., 2003; KAGALE et al., 2004; MORAIS, 2009b).

Há diversos estudos relatando a eficiência de OE na sanitização de verduras, frutas e legumes minimamente processados, sem alterar as características sensoriais, como: OE de hortelã e manjericão, que garantiram uma boa desinfecção de alfaces picadas e beldroega (KARAGOZLÜ et al., 2011); OE de lavanda e hortelã, que preservaram a qualidade de endívia (XYLIA et al., 2017) e OE de tomilho, que foi eficiente na sanitização de alface e frutas (SCOLLARD et al., 2016).

Um grande número de OE apresenta efeito antioxidante, que são protetivos contra a oxidação celular causadora de inúmeras doenças (SHAABAN et al., 2012). Estudo que testou 25 OE, o óleo de tomilho exibiu o maior efeito antioxidante, seguido por folha de cravo, folha de canela, manjericão, eucalipto e camomila (WEI; SHIBAMOTO, 2010).

Há estudos que testaram a ação sinérgica de vários OE com agentes antifúngicos tradicionais e esses potencializaram fortemente a atividade dos agentes

antifúngicos tradicionais (NATU; TATKE 2019), pois há relatos de vários compostos, principalmente os fenólicos, com atividade antifúngica. A capacidade antimicrobiana dos OE depende, em geral, de seus compostos químicos, principalmente de seus compostos fenólicos, como no caso do tomilho são timol, γ-terpineno, carvacrol (BORUGĂ et al., 2014). Alguns OE constituem alternativas ou complementos eficazes aos compostos sintéticos da indústria química, sem apresentar os mesmos efeitos secundários (CARSON e RILEY, 2003; BAKKALI et al., 2008).

Há diversos estudos mostrando a eficiência do uso de OE na agricultura, como repelentes, bioherbicida ou contra fitopatógenos. Uma das motivações para o uso de óleos no controle de pragas nas lavouras é sua baixa, ou mesmo nenhuma, toxidez para o ambiente e para as culturas agrícolas. Entretanto, os OE comercializados atuam como herbicidas não seletivos de contato, que podem dar um bom controle de plantas daninhas, mas com efeito transitório limitado pelo fato de muitos compostos serem voláteis (MORAES et al., 2016). Em experimentos conduzidos por Scarfato et al. (2007) foram sintetizadas e caracterizadas microcápsulas contendo OE para aplicações em formulações de agroquímicos com redução de quantidades aplicadas, aumentando sua eficácia, reduzindo a volatilização e degradação.

Além disso, diversos OE vêm sendo estudados para o desenvolvimento de produtos alternativos para o controle de ervas daninhas, insetos e doenças nas lavouras (SAITO, 2004). Também há estudos de Kim et al. (2010) que avaliaram a eficiência e atividade tóxica do OE de orégano (*Origanum vulgare* L.) sobre adultos de *Tribolium castaneum* (Herbst) (caruncho), aumentando o tempo de armazenamento.

Ensaios realizados por Marinho-Prado et al. (2019), testaram diversos OE quanto ao uso para controle de *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) e *Helicoverpa armigera* (Hubner) (duas importantes pragas de cultivos nacionais) e comprovaram a bioatividade dos OE de manjericão e de tomilho, causando mortalidade nas fases larval e pupal de *A. gemmatalis*. Já na fase adulta, os OE de laranja doce, melaleuca e orégano, afetaram mais fortemente *A. gemmatalis*, acompanhados dos OE de citronela e gengibre, sendo esses últimos responsáveis pela inviabilização de todos os ovos depositados. Sobre lagartas de *H. armigera*, os tratamentos com OE de manjericão, canela e melaleuca, causaram a morte de metade das lagartas

avaliadas. Similarmente, *Callosobruchus maculatus* (FABR.) (Caruncho-do-feijão) tratados com OE de erva-cidreira, apresentou taxa de oviposição e viabilidade da progênie reduzidas (ALVES et al., 2019).

Autores como Alexa et al. (2018) constataram atividade alelopática dos OE de sálvia e tomilho e a capacidade de inibição da germinação das espécies de plantas daninhas testadas (*Amaranthus retroflexus* L., *Chenopodium álbum* L., *Echinochloa crus-galli* L.). Também foi demonstrado o potencial antifúngico do OE de tomilho pela inibição total do crescimento do micélio de *Fusarium graminearum* (Schw.).

Em diversos estudos que investigaram a ação dos OE *in vitro* sobre diversos patógenos, os melhores resultados foram obtidos com os óleos na sua totalidade de compostos voláteis, ou seja, os OE possuem maior atividade antimicrobiana que seus componentes principais isolados ou entre eles misturados, sugerindo que há uma sinergia ou potencial influência dos compostos minoritários na atividade do OE (ROTA et al., 2002). Além disso, novos estudos com relação à toxicidade e mutagenicidade das plantas medicinais vêm ganhando importância, pois esses, além de poderem determinar a constituição química dos OE, podem descobrir quais as substâncias capazes de provocar efeito tóxico, possibilitando, assim, o desenvolvimento de novos fármacos, através da descoberta de novas substâncias bioativas (VIEIRA, et al., 2004).

Existem diversas normas internacionais com padronizações que buscam manter a qualidade dos óleos essenciais, visando o controle de qualidade e a segurança no seu uso, além de evitar adulterações. Exemplo são as monografias das Farmacopeias e as normas ISO (International Organization for Standardization). O comitê técnico TC-54 é responsável por toda a normatização que fornece a padronização de métodos de análise e especificações para OE em geral, bem como sua constante atualização.

2.2.1.3. Mercado mundial

Há uma grande dificuldade em estimar a produção e o comércio mundial de óleo essencial, pois estes dados muitas vezes estão ocultos em estatísticas de uma rede complexa de diversos produtos e, também, não leva em conta a produção

doméstica, ou de pequenos produtores. Quando se fala em dados especificamente do Brasil, a dificuldade aumenta ainda mais.

Os principais produtores de OE, por continente, são: China e Índia (Ásia), Marrocos e Tunísia (África), Estados Unidos, Canadá e México (Américas), França e Alemanha (Europa) (BARBIERI; BORSOTTO, 2018). De acordo com um relatório publicado pela Allied Market Research (2020), o mercado mundial de OE atingiu $ 8 bilhões de dólares em 2018 e é esperado um crescimento de 8,7% até 2026, atingindo $ 15,6 bilhões de dólares. A Europa domina o mercado de OE, representando cerca de 40%, e espera-se que mantenha a posição como principal contribuinte para a receita global, sendo esperado que a região Ásia-Pacífico registre o maior crescimento no período.

Esse mesmo relatório destaca o segmento de óleo de laranja como o maior contribuinte na participação de mercado global de OE, com $ 3 milhões de dólares em 2018, e estima-se que chegue a $ 6,2 milhões de dólares até 2026, com um aumento de 9,3%. Ainda, segundo esse relatório, o segmento de alimentos e bebidas foi o proeminente, podendo ser atribuído aos rígidos regramentos governamentais sobre segurança alimentar, que limitam o uso de sabores sintéticos e essências alimentares. Estima-se que o segmento com maior crescimento no período deve ser o de limpeza e uso doméstico, devido ao aumento da afinidade dos consumidores em relação a soluções livres de produtos químicos para limpeza, além das fragrâncias agradáveis dos produtos de limpeza à base de OE.

De acordo com Observatory of Economic Complexity (OEC), em 2017, o Brasil ocupou o quinto lugar, com 7,5% das exportações mundiais de OE atrás de Estados Unidos (13%), Índia (12%), China (9,6%) e França (8,6%). Ainda segundo o OEC, dentro das exportações brasileiras os OE correspondem a apenas 0,19%, o equivalente a $ 409 milhões de dólares. A posição do Brasil deve-se, basicamente, aos óleos essenciais cítricos, obtidos como subprodutos da indústria de sucos (SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA, 2017).

Dados da Divisão de Estatística das Nações Unidas, do banco de dados de estatísticas do comércio de *commodities* (Commodity Trade Statistics Database – ComTrade), mostram que o Brasil, no ano de 2018, exportou um pouco mais de 28 toneladas de OE de laranja, totalizando $ 258 milhões de dólares; 355 kg de OE de limão ($ 10 milhões de dólares); 270 Kg de OE de frutas cítricas (espécie não

informada); 567 Kg de OE de espécies não informadas; e 158 Kg de OE de hortelã-pimenta. Já no ano de 2019, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil exportou 30 toneladas de OE de laranja, 587 Kg de OE de limão ou de outros cítricos, e 21 toneladas de outros OE, que não de espécies cítricas.

Há, ainda, uma tendência de aumento na utilização de OE, uma vez que há uma multiplicação do dito “consumo verde” por parte da população cada vez mais preocupada com a contaminação causada por produtos químicos sintéticos, especialmente o mercado europeu. Assim, as indústrias cada vez mais buscam produtos de origem vegetal na composição de seus produtos e no controle de pragas na agricultura, bem como a medicina avança na aplicação dos OE e sua grande gama de compostos químicos no tratamento de doenças e combate a superbactérias.

2.3 FAMÍLIA LAMIACEAE

A maioria das espécies da família *Lamiaceae* é conhecida pelo seu uso condimentar e muitas delas possuem atividade biológica já relatada na literatura por diversos autores (LORENZI e MATOS, 2008). Essas espécies biossintetizam, pelo metabolismo secundário, importantes compostos de interesse comercial, dentre eles destacam-se os óleos essenciais.

São diversos os gêneros nessa família, ricos em compostos bioativos, como, por exemplo: *Lavandula*, *Melissa*, *Mentha*, *Ocimum*, *Origanum*, *Plectranthus*, *Rosmarinus*, *Salvia* e *Thymus* (JUDD et al., 2009).

Estudos já demonstraram que infusões em diferentes concentrações de *Mentha pulegium* L., pelo teste de *A. cepa*, possuem atividade antiproliferativa e não genotóxica (TEDESCO et al., 2012). Extratos aquosos de *Peltodon longipes* Kunth ex Benth exibiram efeito antiproliferativo e genotóxico sobre raízes de *A. cepa* (KUHN et al., 2015). Em outro experimento, Farias et al. (2018) mostraram que extratos aquosos de *Rosmarinus officinalis*, nas concentrações de 5 e 20 $g.L^{-1}$, não apresentam efeito mutagênico e ainda possui potencial antimutagênico, reduzindo danos ao DNA decorrentes da exposição ao arsênio.

Em espécies do gênero *Lavandula*, os monoterpenos encontrados com maior frequência são linalol, borneol, cânfora e 1,8-cineol (UPSON e ANDREWS, 2004). O

linalol, composto também presente no óleo essencial de manjericão, é importante para a indústria farmacêutica e cosmética, por ser usado como fixador de fragrâncias (CAMARGO; VASCONCELOS, 2014).

Timol e carvacrol, regularmente presentes nos óleos essenciais dos gêneros *Thymus* e *Origanum*, são exemplos de terpenoides antioxidantes (VANDAR-ÜNLÜ et al., 2003).

2.3.1. *Thymus vulgaris* L.

O tomilho, pertencente ao gênero *Thymus*, é uma planta bastante utilizada na culinária, mas também se destaca pelo seu uso na medicina popular. A planta é um subarbusto (10 a 30 cm) perene, ereto, ramificado, muito aromática, nativa do Mediterrâneo e cultivada no Sul e Sudeste do Brasil (PANIZZA, 1998; LORENZI e MATOS, 2008). Suas folhas são pequenas, opostas, de cor verde acinzentada, de oblongo-lanceoladas a lineares e contam com a presença de tricomas glandulares, as flores são de cor branca-violeta claro (STAHL; VENSKUTONIS, 2012). A espécie cresce bem em condições quentes e áridas, e com solo bem drenado (PATIL et al., 2021).

Acredita-se, que os romanos, para evitar envenenamentos, consumiam o extrato aquoso da planta antes ou durante as refeições (PATIL et al., 2021). Por isso, destaca-se que o tomilho é uma rica fonte de vitaminas, especialmente A e C. Suas folhas são uma excelente fonte de potássio, cálcio, ferro, manganês, magnésio e selênio. (DAUQAN; ABDULLAH, 2017).

Além de ser uma planta utilizada na culinária, como tempero, o tomilho possui outras funções já reconhecidas, como: inseticidas, fungicidas, antimicrobianas e antioxidante (MIRANDA et al., 2015). Na medicina popular, a infusão de tomilho é utilizada para tratar tosse (DAVID; DAVID, 2017), resfriados e diabetes; também é calmante para dor de garganta (EKOH et al., 2014). Há relatos da importância do tomilho em questões dermatológicas, como acne, pele oleosa, dermatite e picadas de insetos (PATIL et al., 2021).

Estudos demonstraram potencial dos extratos aquosos de tomilho para prevenir ou reverter alterações induzidas pelo paracetamol em ratos, através da sua atividade antioxidante (ABD EL-KADER; MOHAMED, 2012). O tomilho também pode

melhorar o funcionamento do fígado e atuar como estimulante do apetite (PRASANTH REDDY et al., 2014).

Estudos *in vitro* já mostraram atividade antitumoral do OE de tomilho em células de leucemia (AAZZA et al., 2014). Nolkemper et al. (2006), testando os extratos aquosos de tomilho, mostraram atividade inibitória contra o vírus do herpes simples (*Herpes Simplex Virus* – HSP).

O óleo essencial do tomilho vem sendo utilizado com finalidade expectorante (HEINZMANN et al., 2017). Na aromaterapia, é utilizado para tratar fadiga, ansiedade, dores de cabeça e reumáticas (AZAMBUJA, 2019). Na indústria cosmética, devido a sua atividade antimicrobiana, o OE de tomilho é utilizado em produtos como: desinfetantes, enxaguantes bucais e cremes dentais (GROSSMAN, 2005).

Devido aos efeitos antibacterianos, antifúngicos e antioxidantes do OE de tomilho, Nowak et al. (2012) indicam seu uso como conservante natural de alimentos. Estudo de Santurio et al. (2014) comprovou a atividade antimicrobiana do OE de tomilho, adicionando este em produto cárneo, concluindo que o óleo pode ser utilizado para aumentar a vida útil de prateleira destes produtos e diminuir a contaminação por coliformes termotolerantes.

Já foram relatados efeitos antifúngicos do OE de tomilho, incluindo espécies de fungos que deterioram alimentos, como *Aspergillus* (KUETE, 2017), e *Phakopsora euvitis*, fungo causador da ferrugem da videira (FIALHO et al., 2015).

Existem relatos de diversos quimiotipos de tomilho, assim como em outras espécies da família *Lamiaceae*, ou seja, embora não haja diferenças morfológicas, existem populações distintas dentro da mesma espécie que apresentam um fenótipo químico distinto, com compostos ativos majoritários diferentes (SCHMIDT et al., 2012). Segundo Wolffenbüttel (2019), os quimiotipos dependem minimamente dos fatores ambientais, pois o que varia é o genótipo entre as plantas. Já foram relatados vários quimiotipos em *T. vulgaris*, que são nomeados de acordo com seu monoterpeno dominante: timol, geraniol, α-terpineol, linalol, carvacrol, β-cimeno, 1-terpineno-4-ol, borneol (THOMPSON et al., 2003; SCHMIDT et al., 2012).

Apesar dessas diferenças na constituição química, no caso do tomilho, autores já demonstraram que os OE dos quimiotipos de *T. vulgaris* igualmente mostraram eficácia contra vários microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos

que contribuem para a deterioração de alimentos (SCHMIDT et al.,2012), evidenciando que apesar das diferenças químicas, há um sinergismo entre os componentes presentes no OE.

O quimiotipo timol de *T. vulgaris* é o mais importante. Como o próprio nome diz, o principal constituinte do OE é o timol (AKSEL, 2008; SHARANGI; GUHA, 2013; DAUQAN; ABDULLAH, 2017), o qual constitui cerca de 50% do total, e é responsável pelas suas propriedades antibióticas (FATIMAH, 2014), sendo ativo contra as bactérias *Salmonella* e *Staphylococcus* (DAUQAN; ABDULLAH, 2017). Além do timol, os principais constituintes voláteis do tomilho são: carvacrol, *p*-cimeno, γ-terpineno (JAKIEMIU et al., 2010; BORUGĂ et al., 2014; FATIMAH, 2014).

Autores como Golparvar e Bahar (2011) e Salehi et al. (2013) sugerem a colheita do tomilho no início da floração, para se obter o maior rendimento do OE.

A composição dos compostos bioativos e sua quantidade vão ser influenciados pelas condições ambientais da área onde são cultivadas e a época de colheita (VAIČIULYTĖ et al., 2017). O cultivo de plantas aromáticas, condimentares e medicinais garante matéria-prima de qualidade e com uma composição química mais homogênea, facilitando a padronização e sua utilização com maior segurança e eficácia (LOŽIENĖ, 2009; VAIČIULYTĖ ET AL., 2017; VAIČIULYTĖ AND LOŽIENĖ, 2015).

A norma internacional ISO 19817 (2017) especifica as características do OE de tomilho, quimiotipo timol, a fim de facilitar a avaliação de sua qualidade.

2.4 TESTES DE CITOGENOTOXICIDADE

Uma utilização segura pela população das inúmeras plantas com efeitos terapêuticos depende de testes prévios de toxicidade. De acordo com Fernandes (2016), são os princípios ativos das plantas que frequentemente apresentam potencial tóxico, como: alcaloides, compostos fenólicos (taninos), saponinas e terpenos (óleos essenciais, esteroides). Se, por outro lado, essas substâncias podem provocar reações adversas a quem as consome, muitas delas, quando utilizadas de forma consciente e terapêutica, apresentam propriedades benéficas no tratamento de diversas patologias. É sabido que é a dose que diferencia a eficácia da toxidez de uma substância, e a chave é conhecer as doses adequadas e sua

forma de aplicação, afim de evitar sérios problemas (MORAES; MARINHO-PRADO, 2016).

O teste de *Allium cepa* é um excelente modelo *in vivo*, pois as raízes de cebola ficam em contato direto com a substância a ser testada, e, assim, serve para prever danos ao DNA de eucariotos (TEDESCO; LAUGHINGHOUSE IV, 2012).

2.4.1. Teste de *Allium cepa*

O uso da citogenética, através do teste de *A. cepa*, para identificação de possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos de extratos vegetais é amplamente utilizado por pesquisadores como: Kuhn et al. (2015) – *Peltodon longipes* Kunth. ex Benth., Coelho et al. (2017) – *Echinodorus grandiflorus* (Cham & Schltdl.) Micheli e *Sagittaria montevidensis* Cham. & Schlecht, Hister et al. (2019) – *Psidium cattleianum* Sabine e Trapp et al. (2020) – *Plectranthus barbatus* Andrews. Estudos de citogenotoxicidade de óleos essenciais sobre células meristemáticas de raízes de *A. cepa* também já foram realizados por: Hister et al. (2009) – *Aloysia gratissima*, Frescura (2014) – *Rosmarinus officinalis* L., Pasqualli (2016) – *Baccharis dracunculifolia* DC e Ubessi et al. (2019) – *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert.

Além de sua longa história de uso em testes citotoxicológicos, outras vantagens no uso de *A. cepa* são seus cromossomos grandes e facilmente observados ao microscópio; além de que esses podem revelar um efeito (positivo/negativo) mesmo em níveis relativamente baixos de interação da substância testada com o material genético; e se tratando de um teste *in vivo*, os resultados obtidos podem ser utilizados para avaliação de genotoxicidade em plantas e em outros eucariotos, inclusive o homem (BONCIU et al. 2018).

A toxicidade genética pode ser refletida, inicialmente, pela inibição do crescimento das raízes de cebola (citotoxicidade) e, também, pela presença de alterações nos cromossomos (genotoxicidade) (FISKESJÖ, 1995). O aparecimento de alterações no ciclo celular de organismos – teste – tanto pela inibição ou incremento da divisão celular como pela ocorrência de mutações cromossômicas – é um indicativo de citogenotoxicidade das substâncias avaliadas (SOUZA et al. 2005).

Um aumento no índice mitótico de células meristemáticas de *A. cepa* pode levar a uma multiplicação desordenada de células, o que pode ocasionar, também,

um maior número de mutações e resultar na formação de tumores nos seres vivos (LEME; MARIN-MORALES, 2009). As substâncias genotóxicas têm propriedades químicas e físicas em comum, que possibilitam sua interação com os ácidos nucleicos, e a sua detecção através de biotestes permite a identificação de possíveis riscos à saúde humana (VARANDA, 2006).

O teste de *A. cepa* realizado de forma conjunta com outros testes (EREN; ÖZATA, 2014) e testes utilizando células animais *in vitro* demostraram resultados semelhantes (VICENTINI et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2003; PALMIERI et al., 2014), mostrando correlação entre ensaios utilizando diferentes tipos de células, validando estes modelos como sensíveis e confiáveis para testar o potencial citogenotóxico de quaisquer compostos naturais/químicos/sintéticos. Desta forma, os estudos utilizando *A. cepa* como organismo-teste podem fornecer relevantes informações para garantir a segurança no uso de plantas medicinais, aromáticas e condimentares pela população em geral.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTIVO DE TOMILHO EM ESTUFA

O experimento foi instalado em casa de vegetação adaptada com sistema de fertirrigação, localizada no Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Santa Maria é uma cidade de clima Cfa (subtropical úmido, com verão quente, podendo haver estiagem), segundo Köeppen, localizada no centro do estado do Rio Grande do Sul (S: 29 ° 42 '23' '; W: 53 ° 43' 15 '', a 95 metros de altitude ao nível do mar), tendo como característica a nítida divisão entre as estações climáticas. O experimento foi conduzido em duas estações climáticas diferentes, inverno (com início em junho de 2018) e verão (com início em dezembro de 2018). O mesmo experimento foi repetido no ano de 2019, também em duas estações, inverno (com início em junho de 2019) e verão (com início em dezembro de 2019).

As mudas de *Thymus vulgaris*, de tamanho homogêneo, foram adquiridas na Floricultura do Colégio Politécnico, UFSM, e transplantadas para vasos de polipropileno de 4 dm^3, preenchidos com substrato Maxfertil®, que apresenta formulação de 85% casca de *Pinus* compostada, 10% Vermiculita e 5% cascas carbonizadas de arroz e *Pinus*, além de aditivos corretivo de acidez (0,50%), fosfato natural (0,50%) e fertilizante mineral N-P-K (0,60%). Os vasos ficaram sobre bancadas, dentro de estufa de polietileno de baixa densidade, com espessura de 100 µm.

Em cada bancada havia um reservatório de 500 L para estocar a solução nutritiva. Ambos os experimentos foram compostos por cinco bancadas, cada uma contendo 20 vasos (Figura 2), totalizando 100 vasos por experimento. Em cada uma das bancadas, as plantas receberam soluções nutritivas com as diferentes concentrações de N. Durante o período em que as plantas permaneceram na estufa, as unidades experimentais (vasos) foram movimentadas de lugar, aleatoriamente, nas bancadas, mantendo sempre a divisão dos grupos de tratamentos.

Figura 2 – *Thymus vulgaris* L. (tomilho) cultivado em ambiente protegido no Departamento de Fitotecnia, na Universidade Federal de Santa Maria

Fonte: próprio autor.

A solução nutritiva foi fornecida para as plantas por meio de uma fita gotejadora, que foi conectada a uma bomba submersa dentro de cada reservatório. Um *timer* foi utilizado para programar o horário de fornecimento da solução nutritiva, três vezes ao dia. Em cada fertirrigação, o excedente da solução nutritiva era drenado através das bancadas, sendo a solução drenada recolhida por encanamentos que retornavam ao reservatório de origem, em sistema fechado.

A solução nutritiva para o cultivo do tomilho foi baseada na proposta elaborada por Frescura et al. (2018), que utilizou para o cultivo de *Rosmarinus officinalis* (alecrim), também pertencente à família *Lamiaceae*, com pequenas modificações para que as concentrações de N fossem aumentando entre as bancadas (tratamentos), totalizando: 5, 7, 9, 11 e 13 mmol.L^{-1}, fornecido sob forma de NO_3^- e NH_4^+. Os demais nutrientes tiveram a mesma composição (em mmol.L^{-1}) em todos os tratamentos: 1,4 de H_2PO^{4-}; 4 de K^+; 3,06 de Ca^{+2}; 2 de Mg^{+2} e 6 de

SO_4^{-2}. O fornecimento dos micronutrientes foi feito por solução composta de (mmol.L^{-1}): 0,03 de Mo; 0,26 de B; 0,06 de Cu; 0,50 de Mn; 0,22 de Zn por meio de uma solução estoque e, o quelato de ferro, separadamente (1 mg.L^{-1}).

A condutividade elétrica (CE) para a solução padrão foi mantida em 1,5 dS.m^{-1}. Um desvio máximo de 20% na CE foi tolerado, e para possíveis correções foi utilizada, dependendo da necessidade, água ou alíquotas de nova solução nutritiva. Foi mantido um pH entre 5,5 e 6,5, permitindo-se um desvio de 0,2 unidades, e, conforme a necessidade, adicionou-se NaOH ou H_2SO_4 na concentração de 1N. Sempre que o volume final foi igual ou inferior a 50% do volume original, a solução nutritiva foi completada.

Aos 60 dias de estufa do primeiro experimento de inverno, a coleta das plantas foi realizada. A fim de mensurar os efeitos da sazonalidade, o material foi coletado no dia que marcou a metade da estação (06 de agosto de 2018). Foi calculada a soma térmica referente aos 60 dias em que as plantas permaneceram na estufa durante o inverno. Para o experimento do verão, utilizou-se a soma térmica do inverno, para definir o dia da coleta das plantas, que foi quando a soma térmica do verão atingiu um valor próximo a do inverno.

O cálculo da soma térmica diária (STdºC dia) seguiu o método proposto de Gilmore e Rogers (1958) e Arnold (1960), no qual:

$$STd = Tmed - Tb.\ 1\ dia;\ se\ Tmed < Tb,\ então\ Tmed = Tb.$$

Levando-se em consideração que Tb = temperatura basal (ºC) para a espécie, e como não há relatos na literatura sobre a temperatura basal para *T. vulgaris*, convencionou-se usar 0 ºC como a temperatura basal; Tmed = temperatura média (ºC) diária do ar, calculada pela média aritmética entre as temperaturas mínima e máxima diárias do ar, de acordo com a estação convencional do INMET/8º DISME, localizada à aproximadamente 500 metros da área experimental.

Das vinte plantas de cada tratamento (bancada), quatro plantas foram coletadas para a verificação da produção de fitomassa, avaliando-se o peso da massa fresca e da massa seca das plantas. Doze plantas por tratamento foram separadas para a extração de óleo essencial e outras duas para o preparo dos extratos aquosos.

3.2 ANÁLISE DOS MATERIAIS COLETADOS

3.2.1. Determinação da fitomassa

A coleta das plantas de tomilho foi realizada no início da manhã. No primeiro experimento, as plantas foram coletadas 60 dias após serem colocadas na estufa, ou seja, dia 06 de agosto de 2018, e calculou-se a soma térmica referente a esses dias. Nos demais experimentos, quando a soma térmica se aproximou do valor do primeiro, as plantas foram coletadas.

Imediatamente, após a coleta foi determinada a massa fresca (MF), pesando-se quatro plantas inteiras por tratamento, em balança analítica. Após, as plantas foram secas em estufa de circulação forçada de ar, à temperatura de 60ºC, e foram novamente pesadas para determinação da massa seca (MS).

3.2.2. Extração do óleo essencial

A extração do óleo essencial de *T. vulgaris* foi realizada a partir de plantas inteiras (folhas e caules) frescas congeladas. No segundo ano, optou-se, também, por realizar a extração de óleo essencial de plantas secas. Este processo foi realizado no Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade (LABCITOGEN) do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE), UFSM.

O processo utilizado para a extração do óleo essencial de plantas frescas e secas foi o de hidrodestilação. Em um balão de fundo redondo, com capacidade de um litro, foram colocados 50 g de material fresco congelado, acrescentando-se 700 mL de água destilada e levados à fervura por duas horas, após o início da ebulição, em aparelho Clevenger (Figura 3). Para a extração de óleo de material seco, foi utilizado um balão de fundo redondo, com capacidade de dois litros, e foram colocados 25 g de material seco, acrescentando-se um 1,3 L de água destilada e conduzidos à fervura por duas horas.

Figura 3 – Extração de óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. (tomilho) por hidrodestilação em aparelho Clevenger

Fonte: próprio autor.

Após a extração, o óleo essencial foi coletado na forma de sobrenadante, depositados em frasco âmbar, pesado em balança analítica, identificado e armazenado a 4°C ± 2ºC, até a sua utilização. Na sequência, o óleo essencial foi utilizado para a determinação do rendimento, do teor, para a análise da citogenotoxicidade através do teste de *A. cepa* e para a análise da composição fitoquímica por cromatografia gasosa.

3.2.3. Cálculo do rendimento e teor do óleo essencial

O rendimento do óleo essencial (ROE), expresso em porcentagem de gramas por peso da massa fresca (%g.MF^{-1}), foi determinado pela seguinte equação:

$$ROE = \frac{\text{média da massa fresca do tratamento X peso (gramas) de óleo extraído}}{\text{massa da amostra (g)}}$$

O teor de OE foi obtido através da relação entre o peso (g) do óleo extraído e o peso da amostra (g), multiplicado por 100, para se obter o valor do teor em porcentagem. Destaca-se, que esses cálculos foram realizados em três repetições, a fim de verificar se fatores extrínsecos, como diferentes estações climáticas (inverno e verão) e diferentes aportes de N, afetam a produção de óleo essencial de *T. vulgaris*.

3.2.4. Preparo dos extratos aquosos e diluição do óleo essencial

O preparo dos extratos aquosos foi realizado no Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade (LABCITOGEN), do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE), UFSM. Plantas frescas (congeladas) e secas de *T. vulgaris* foram utilizadas no preparo dos extratos aquosos, por infusão em água destilada, por 10 minutos, nas concentrações de 6 $g.L^{-1}$ (MARTINS et al., 2000) e de 12 $g.L^{-1}$, conforme Figura 4a. Após o preparo, os extratos foram filtrados e utilizados no teste de *A. cepa* para análise de citogenotoxicidade.

Figura 4 – Preparação dos extratos aquosos (a) e diluição do óleo essencial (b) de *Thymus vulgaris* L. (tomilho)

Fonte: próprio autor.

Uma amostra de cada extrato foi então liofilizada no Laboratório de Análise Fitoquímica, do Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde (CCS), UFSM. O material liofilizado foi utilizado para a determinação dos compostos fenólicos, por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE).

A diluição do óleo essencial foi realizada com etanol absoluto, obtendo-se as concentrações de 0,10% e 0,25%, Figura 4b. Amostras de óleo (extraído de plantas coletadas no inverno e no verão) foram analisadas por cromatografia gasosa (CG) para determinação da composição fitoquímica.

3.2.5. Tratamentos e critérios de análise pelo teste de *Allium cepa*

A análise citogenética utilizando o teste de *A. cepa* foi conduzida no LABCITOGEN, CCNE, UFSM. Este bioteste consiste no exame de células meristemáticas de raízes de *A. cepa* (cebola) para a determinação de índices mitóticos e na busca por alterações cromossômicas.

Para o teste de citogenotoxicidade dos extratos aquosos de tomilho, 10 grupos de quatro bulbos de cebola (repetições) foram colocados em água destilada, até emitirem raízes, conforme a Figura 5.

Figura 5 – Bulbos de cebola (*Allium cepa*) dispostos em copos plásticos com água destilada, aguardando a emissão de raízes

Fonte: próprio autor.

Após a emergência das raízes, cada grupo de quatro bulbos de cebolas foi transferido para um dos tratamentos a seguir: controles (controle negativo = água destilada e controle positivo = herbicida glifosato) e extratos aquosos de tomilho,

onde permaneceram por 24 horas. A descrição detalhada dos tratamentos e controles utilizados são os apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Tratamentos utilizados na avaliação da cito e genotoxicidade dos extratos aquosos de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), pelo teste de *Allium cepa*

Tratamento	Descrição
CN	Controle negativo em água destilada
CP	Controle positivo em glifosato 2%
EAF6I	Extrato aquoso de 6 $g.L^{-1}$ – infusão de plantas de tomilho frescas congeladas coletadas no inverno
EAF6V	Extrato aquoso de 6 $g.L^{-1}$ – infusão de plantas de tomilho frescas congeladas coletadas no verão
EAF12I	Extrato aquoso de 12 $g.L^{-1}$ – infusão de plantas de tomilho frescas congeladas coletadas no inverno
EAF12V	Extrato aquoso de 12 $g.L^{-1}$ – infusão de plantas de tomilho frescas congeladas coletadas no verão
EAS6I	Extrato aquoso de 6 $g.L^{-1}$ – infusão de plantas de tomilho secas coletadas no inverno
EAS6V	Extrato aquoso de 6 $g.L^{-1}$ – infusão de plantas de tomilho secas coletadas no verão
EAS12I	Extrato aquoso de 12 $g.L^{-1}$ – infusão de plantas de tomilho secas coletadas no inverno
EAS12V	Extrato aquoso de 12 $g.L^{-1}$ – infusão de plantas de tomilho secas coletadas no verão

Fonte: próprio autor.

Posteriormente, para o teste de citogenotoxicidade do óleo essencial de tomilho, sete grupos de quatro bulbos de cebola (repetições) foram colocados em água destilada, até emitirem raízes. Após a emergência das raízes, cada grupo de quatro bulbos de cebolas foi transferido para um dos tratamentos a seguir: controles (controle negativo = água destilada; controle negativo relativo à diluição do óleo = etanol; e controle positivo = glifosato) e óleos essenciais diluídos de tomilho, onde também permaneceram por 24 horas. A descrição detalhada dos tratamentos e controles utilizados neste segundo experimento são os apresentados na Tabela 2.

Em ambos os experimentos, após o período de aplicação dos tratamentos, as raízes foram coletadas, incluindo tratamentos e controles, fixadas em etanol: ácido acético (na proporção 3:1), por 24 horas, e armazenadas em etanol 70% sob refrigeração.

Tabela 2 - Tratamentos utilizados na avaliação da cito e genotoxicidade do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), pelo teste de *Allium cepa*

Tratamento	Descrição
CN	Controle negativo em água destilada (CN)
CNE	Controle negativo em etanol (CNE)
CP	Controle positivo em glifosato 2% (CP)
OE010I	Óleo essencial (0,10%) - extraído de plantas de tomilho frescas congeladas coletadas no inverno
OE010V	Óleo essencial (0,10%) - extraído de plantas de tomilho frescas congeladas coletadas no verão
OE025I	Óleo essencial (0,25%) - extraído de plantas de tomilho frescas congeladas coletadas no inverno
OE025V	Óleo essencial (0,25%) - extraído de plantas de tomilho frescas congeladas coletadas no verão

Fonte: próprio autor.

O preparo das lâminas seguiu o método de esmagamento (GUERRA e SOUZA, 2002), com pequenas modificações. Onde, primeiramente, as raízes de cebola armazenadas em etanol 70% foram lavadas em água destiladas e, após, hidrolisadas em ácido clorídrico (HCl) 1N, por cinco minutos. Em seguida, as raízes foram novamente lavadas com água destilada e colocadas sobre uma lâmina histológica, onde, com o auxílio de pinça e agulha a região meristemática foi seccionada e corada com uma gota de orceína acética 2%. Após, com o auxílio de um bastão de vidro, a região meristemática, juntamente com o corante, foi esmagada e sobre esse material foi colocada uma lamínula.

Para cada tratamento, duas lâminas foram preparadas (repetições). Ao microscópio óptico da marca Leica, as lâminas foram examinadas pelo método de varredura, no aumento de 40X. Em cada lâmina, quinhentas células foram analisadas, totalizando 1000 células por bulbo e 4000 células por tratamento.

As células meristemáticas analisadas foram classificadas de acordo com o estágio da divisão celular em que foram encontradas (interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase). O índice mitótico (IM) foi calculado pela razão do número de células em divisão pelo número total de células analisadas e multiplicado por 100, para se obter o IM em porcentagem (%). Irregularidades cromossômicas, como micronúcleos, metáfases desorganizadas, pontes na anáfase e telófase, cromossomos adiantados, fragmentos de cromossomos perdidos, entre outras, também foram contabilizadas e fotografadas. O índice genotóxico (IG) foi calculado pela razão do número de células com alterações, pelo número total de células analisadas e multiplicado por 100.

3.2.6. Análise fitoquímica por cromatografia

Nos extratos aquosos, bem como no OE tomilho, foram realizadas análises cromatográficas, no Laboratório de Extrativos Vegetais (LABEVE), do Departamento de Ciências Florestais, CCR, UFSM.

3.2.6.1 Cromatografia líquida

As amostras de tomilho foram analisadas por cromatografia líquida de ultra eficiência em aparelho UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*) acoplado a um detector DAD (*Diode Array Detector*) (Agilent 1200 infinity), equipado com bomba, injetor automático, e utilizando uma pré-coluna Poroshell 120 EC-C18 (3,0 x 5 mm; 2,7 nm) e uma coluna cromatográfica de fase reversa Poroshell 120 EC-C18 (4,6 x 50 mm; 2,7 µm). O equipamento foi operado a temperatura ambiente (23° ± 1°C) e os dados foram obtidos e processados usando o *software* ChemStation (Hewlett Packard, Alemanha).

O método cromatográfico empregado foi baseado na metodologia descrita por Evaristo e Leitão (2001), com adaptações. A fase móvel consistiu em 1% (v/v) de ácido acético grau HPLC (Sigma-Aldrich®) em água ultrapura, com pH igual 4 ajustado com hidróxido de amônio (fase A), e metanol grau HPLC (Tedia®) (fase B). As amostras de extratos aquosos de tomilho liofilizadas (de plantas secas cultivadas no inverno - PSI e de plantas frescas cultivadas no verão - PFV) foram diluídas na fase B (metanol), já a amostra de extrato de plantas secas cultivadas no verão (PSV) foi diluída na fase A (ácido acético 1%, pH = 4) (1 $mg.mL^{-1}$). Os padrões analíticos de referência foram diluídos em metanol (fase B) e as respectivas curvas analíticas em diferentes concentrações foram construídas.

Todas as amostras foram injetadas (volume de injeção de 5 µL) sob as seguintes condições cromatográficas: temperatura da coluna de 40 °C, fluxo de 1,2 $mL.min^{-1}$, tempo total de análise de 45 min e pressão máxima de 400 bar. O gradiente de eluição dos solventes A e B encontra-se descrito na Tabela 3. O comprimento de onda de detecção eleito para a análise foi de 250 nm. Todas as

amostras foram analisadas em triplicata. A amostra de extrato aquosos de plantas frescas cultivadas no inverno (PFI) não foi possível de ser analisada pois havia material insuficiente.

Os extratos aquosos de tomilho foram analisados quanto à presença dos seguintes compostos fenólicos: ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido elágico, ácido gálico, ácido rosmarínico, apigenina, catequina, epicatequina, canferol, luteolina, quercetina e rutina (Sigma-Aldrich®, pureza ≥ 95%). A identificação dos picos de cada amostra foi realizada utilizando os cromatogramas obtidos em cada injeção e comparados com os espectros de absorção e tempos de retenção dos padrões. A quantificação do composto identificado foi realizada a partir de curva analítica, obtida utilizando os padrões analíticos de referência sob condições cromatográficas idênticas às das amostras.

Tabela 3 - Gradiente de eluição dos solventes A e B

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	100	0
5	90	10
10	80	20
15	70	30
20	50	50
25	30	70
30	20	80
35	10	90
40	0	100

A = ácido acético grau HPLC (Sigma-Aldrich®); B = metanol grau HPLC (Tedia®).
Fonte: próprio autor.

3.2.6.2 Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foi utilizada para determinar a composição química do óleo essencial de tomilho. Foi utilizado um sistema hifenado AGILENT 7890A, equipado com um detector seletivo de massas série 5075C (CG-EM). Para a análise de extrativo, uma alíquota de 2 µL de OE foi diluída em 1 mL de hexano (grau HPLC).

Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida DB5-MS (Hewlett Packard, 5% de fenil, 95% de metilsiloxano, 30 m x 0,25 mm, espessura de filme: 0,25 mm). Em relação aos parâmetros, a energia de ionização foi de 70 eV, a divisão de fluxo 1: 100 e o programa de temperatura foi o seguinte: 40 °C durante 4 min; 40 - 320 ºC a

4ºC.min^{-1}. O gás carreador foi o hélio, com taxa de fluxo de 1 mL.min^{-1}. A temperatura configurada para injetor e detector foi de 150°C e 280°C, respectivamente. A identificação dos constituintes ocorreu por comparação dos seus índices de retenção, determinados por uma curva de calibração de n-alcanos injetados sob as mesmas condições cromatográficas das amostras, e dos padrões de fragmentação de massas com os mencionados na literatura (ADAMS, 2009; NIST, 2010).

Os compostos químicos do OE foram quantificados por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (CG/DIC), num equipamento Agilent 7890A. Os parâmetros das análises corresponderam aos descritos anteriormente, com exceção dos seguintes: injeção com divisão de fluxo de 1:50; temperatura do injetor e detector: 300ºC. A determinação da percentagem dos componentes químicos ocorreu com base na normalização de área dos picos.

3.2.7. Análise estatística

O delineamento utilizado no experimento da estufa foi o inteiramente casualizado (DIC), conduzidos em esquema bifatorial (2X5), com um fator qualitativo, duas estações do ano, e um fator quantitativo, cinco concentrações de nitrogênio (N) na solução nutritiva. Todos os dados de produção de fitomassa, de rendimento e de teor de óleo essencial foram submetidos à análise de variância (ANOVA), foram comparados pelo teste de Scott-Knott e avaliados por regressão polinomial, a 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o programa estatístico SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2014).

O teste de *Allium cepa* foi conduzido de acordo com o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Dentro de cada repetição foram realizadas análises de lâminas em duplicata. Os dados correspondentes ao teste de *A. cepa*, índice mitótico (IM) e índice genotóxico (IG), foram comparados pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Os dados referentes à análise fitoquímica e quantificação dos compostos presentes no óleo essencial foram submetidos à estatística multivariada, com análise de agrupamento hierárquico utilizando o *software* GENES (CRUZ, 2013),

utilizando a distância de Mahalanobis como medida de dissimilaridade, e o agrupamento foi realizado pelo método de Tocher.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro ano (2018), a soma térmica correspondente aos 60 dias do experimento do inverno, a qual foi calculada em ST = 827,15, tendo como temperatura média neste período 13,3ºC. Nesse período, a média da insolação total diária – intervalo total de tempo (entre o nascimento e o pôr do sol) em que o sol não esteve oculto – foi de 3,63 horas.

No experimento do verão (2018/19) as plantas foram coletadas quando a soma térmica atingiu um valor próximo a do inverno (STd = 836,85), completando 33 dias na estufa, sendo nesses dias a temperatura média de 25,3ºC e a insolação total diária média de 6,84 horas. A análise de variância demonstrou a presença de interação significativa entre os dois fatores analisados: estações de cultivo (inverno e verão) *versus* tratamentos (diferentes concentrações de N na solução nutritiva).

No segundo ano do experimento, no inverno de 2019, quando a soma térmica atingiu um valor aproximado ao do primeiro ano (STd = 837,45), as plantas foram coletadas, totalizando 58 dias, tendo como temperatura média no período de 14,9ºC e a insolação total diária média de 4,93. Já no segundo experimento do verão (2019/20), as plantas ficaram 33 dias na estufa (STd = 839,10), recebendo os nutrientes por fertirrigação, sendo a temperatura média no período de 25,4ºC. Nesse período, a insolação total diária média foi de 8,5 horas.

Como no primeiro ano do experimento, a análise de variância demonstrou a presença de interação significativa entre os dois fatores analisados: estações de cultivo (inverno e verão) *versus* tratamentos (diferentes concentrações de N na solução nutritiva).

4.1 DETERMINAÇÃO DA FITOMASSA

Nos experimentos em estufa, após a coleta, quatro plantas por tratamento foram separadas aleatoriamente para pesagem e determinação da massa fresca e,

posteriormente, da massa seca (Figura 6), e, a seguir, foi efetuado o cálculo da média para cada tratamento.

Figura 6 – Pesagem de plantas de *Thymus vulgaris* L. (tomilho) frescas, logo após a colheita, e após secagem em estufa à 60ºC

Fonte: próprio autor.

A fitomassa fresca, dos dois experimentos em estufa (repetição ano 1 e ano 2), podem ser observadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores médios da fitomassa fresca de plantas de *Thymus vulgaris* L. (tomilho) cultivadas sob diferentes concentrações de nitrogênio (N), nas épocas de inverno e verão, nos anos de 2018 a 2020

	Inverno 2018	Verão 2018/19	Inverno 2019	Verão 2019/20
Tratamento	MF (g)	MF (g)	MF (g)	MF (g)
1	10,40^{aA}	10,36^{aA}	12,79^{aA}	17,50^{aA}
2	10,63^{aA}	8,92^{aA}	17,69^{aB}	24,43^{aB}
3	12,40^{aA}	11,92^{aA}	17,99^{aA}	24,86^{aB}
4	15,40^{aA}	12,51^{aA}	20,09^{aB}	23,26^{aB}
5	13,61^{aA}	24,35^{bC}	19,30^{aB}	34,95^{bD}

T1 = Concentração de N na solução nutritiva de 5 mmol.L^{-1}, T2 = 7 mmol.L^{-1}, T3 = 9 mmol.L^{-1}, T4 = 11 mmol.L^{-1} e T5 = 13 mmol.L^{-1}. MF = massa fresca.
*Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$). As letras minúsculas comparam os tratamentos e as maiúsculas comparam as estações.
Fonte: próprio autor.

A fitomassa seca, dos dois experimentos em estufa (repetição ano 1 e ano 2), podem ser observadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores médios da fitomassa seca de plantas de *Thymus vulgaris* L. (tomilho) cultivadas sob diferentes concentrações de nitrogênio (N), nas épocas de inverno e verão, nos anos de 2018 a 2020

	Inverno 2018	Verão 2018/19	Inverno 2019	Verão 2019/20
Tratamento	MS (g)	MS (g)	MS (g)	MS (g)
1	2,33^{aA}	1,58^{aA}	2,83^{aB}	3,84^{aB*}
2	2,81^{aB}	1,61^{aA}	3,96^{aC}	5,30^{aD}
3	2,85^{aA}	1,89^{aA}	4,24^{aB}	5,10^{aB}
4	3,70^{aB}	2,21^{aA}	4,75^{aB}	4,71^{aB}
5	3,09^{aA}	4,08^{bA}	4,27^{aA}	6,36^{bB}

T1 = Concentração de N na solução nutritiva de 5 mmol.L^{-1}, T2 = 7 mmol.L^{-1}, T3 = 9 mmol.L^{-1}, T4 = 11 mmol.L^{-1} e T5 = 13 mmol.L^{-1}. MS = massa seca.
*Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$). As letras minúsculas comparam os tratamentos e as maiúsculas comparam as estações.
Fonte: próprio autor.

As MF e MS, no período do inverno de 2018, não diferiram estatisticamente entre os tratamentos. No período do verão 2018/19, a MF e a MS do tratamento 5 (maior dose de N = 13 mmol.L^{-1}), 24,35 g e 4,08 g, respectivamente, diferiram estatisticamente dos demais tratamentos. Dessa maneira, evidencia-se que além do aumento da concentração de N na solução nutritiva, a temperatura maior observada na estação verão, dos anos de 2019 e 2020, teve um papel importante no aumento do crescimento vegetativo das plantas de tomilho.

Na repetição do experimento, da mesma maneira que ocorreu no ano anterior, no inverno de 2019, as MF e MS não diferiram estatisticamente entre os tratamentos. No período do verão 2019/20, apenas a MF e a MS do tratamento 5 diferiram estatisticamente dos demais tratamentos (34,95 g e 6,36 g, respectivamente).

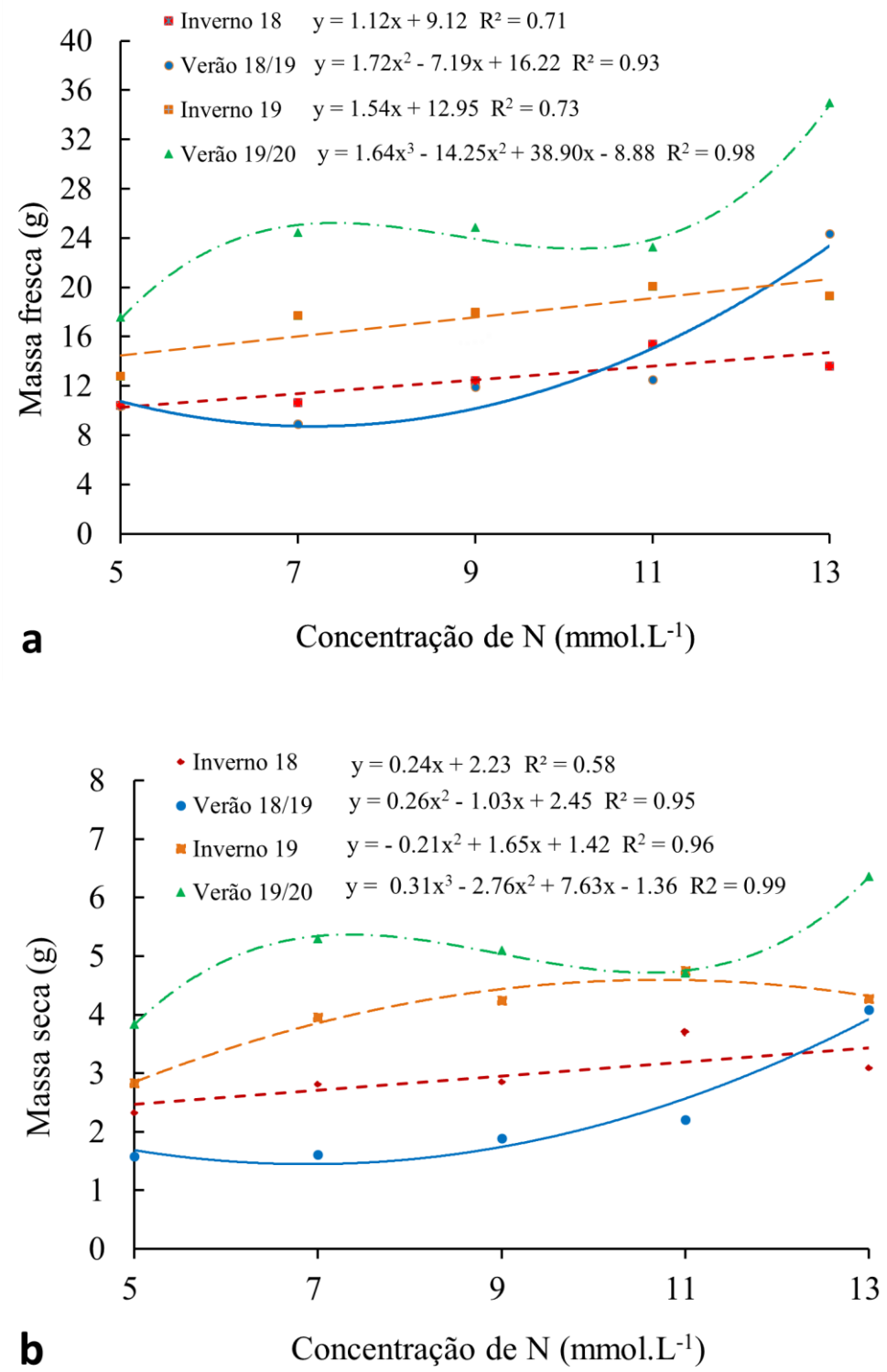
Percebe-se que a fitomassa, no inverno, tanto no ano de 2018 como no ano 2019, ocorreu um pequeno aumento, porém, não o suficiente para ocorrer diferença significativa entre os tratamentos. Por outro lado, nos experimentos de verão, com uma temperatura média 12ºC superior, as plantas comportaram-se de maneira diferente, sendo o tratamento 5 o único que diferiu estatisticamente dos demais tratamentos, tanto para a MF como para a MS. No verão 2018/19, a MF do tratamento 5 (24,35 g) foi 94,6% superior a do tratamento 4 (12,51 g) e 78,9% maior que o mesmo tratamento 5 (13,61 g), do inverno 2018. A MF do tratamento 5 (34,95 g), no verão 2019/20, foi 50,2% maior que a do tratamento 4 (23,26 g) e 81% maior que o tratamento 5 (19,30 g), do inverno 2019.

Em estudo realizado por Mortensen (2014), o aumento de 6ºC na temperatura, de 18ºC para 24ºC, aumentou o peso de tomilho em 58%. Além da temperatura que estimula o desenvolvimento das plantas de tomilho, acredita-se que o aumento da disponibilidade de N também interfira positivamente no crescimento, uma vez que foi calculada a soma térmica nos períodos em que as plantas permaneceram na estufa. Do tratamento 1 (N = 5 $mmol.L^{-1}$) ao tratamento 5 (N = 13 $mmol.L^{-1}$) houve um aumento de 135% no primeiro experimento de verão (2018/19) na massa fresca produzida, de 10,36 g a 24,35 g, e 99% no segundo verão (2019/20), de 17,50 g a 34,95 g.

Em experimento realizado por Baranauskiené et al. (2003), doses diferentes de fertilizantes nitrogenados em plantação de tomilho não tiveram efeito significativo sobre o teor e a composição do óleo essencial, porém, resultou em maior produção de biomassa e, consequentemente, em maiores rendimentos de óleo essencial por área de cultivo, sendo as doses de 45-90 $kg.ha^{-1}$ as mais eficazes.

A Figura 7 mostra o progresso da fitomassa, à medida que houve um aumento no aporte de N disponível na solução nutritiva e, também, entre o inverno de 2018 e o verão de 2018/19, quando as maiores temperaturas influenciaram positivamente o crescimento das plantas de tomilho.

Figura 7 – Aumento da fitomassa de plantas de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) em relação às diferentes concentrações de nitrogênio (N) na solução nutritiva e épocas de cultivo (inverno 2018 e 2019; verão 2018/19 e 2019/20)



a) Massa fresca; b) Massa seca.
Fonte: próprio autor.

4.2 RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL

Os resultados médios de rendimento do óleo essencial de *T. vulgaris* fresco congelado, obtido na extração por hidrodestilação em Clevenger estão apresentados na Tabela 6. Através do cálculo de rendimento do óleo essencial de tomilho, demonstrado em porcentagem de gramas por peso da massa fresca (%g.MF^{-1}), constatou-se que o aumento do aporte de N e a temperatura mais elevada proporcionaram um maior crescimento vegetativo das plantas de tomilho, e, consequentemente, fez aumentar o rendimento do óleo essencial.

Tabela 6 - Valores médios do rendimento do óleo essencial extraído a partir de plantas de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) frescas congeladas, cultivadas sob diferentes concentrações de nitrogênio (N), nas épocas de inverno e verão

	Inverno 2018	Verão 2018/19	Inverno 2019	Verão 2019/20
Tratamento	ROE (%g.MF^{-1})	ROE (%g.MF^{-1})	ROE (%g.MF^{-1})	ROE (%g.MF^{-1})
1	2,30^{aA}	2,80^{aA}	2,23^{aA}	3,40^{aA*}
2	3,67^{aA}	2,47^{aA}	2,33^{aA}	5,70^{bB}
3	3,53^{aA}	3,63^{aA}	3,10^{aA}	5,83^{bB}
4	5,07^{bA}	4,03^{aA}	5,07^{bA}	6,67^{bB}
5	5,07^{bA}	8,30^{bB}	5,80^{bA}	10,27^{cC}

T1 = Concentração de N na solução nutritiva de 5 mmol.L^{-1}, T2 = 7 mmol.L^{-1}, T3 = 9 mmol.L^{-1}, T4 = 11 mmol.L^{-1} e T5 = 13 mmol.L^{-1}. ROE = rendimento do óleo essencial.
*Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$). As letras minúsculas comparam os tratamentos e as maiúsculas comparam as estações.
Fonte: próprio autor.

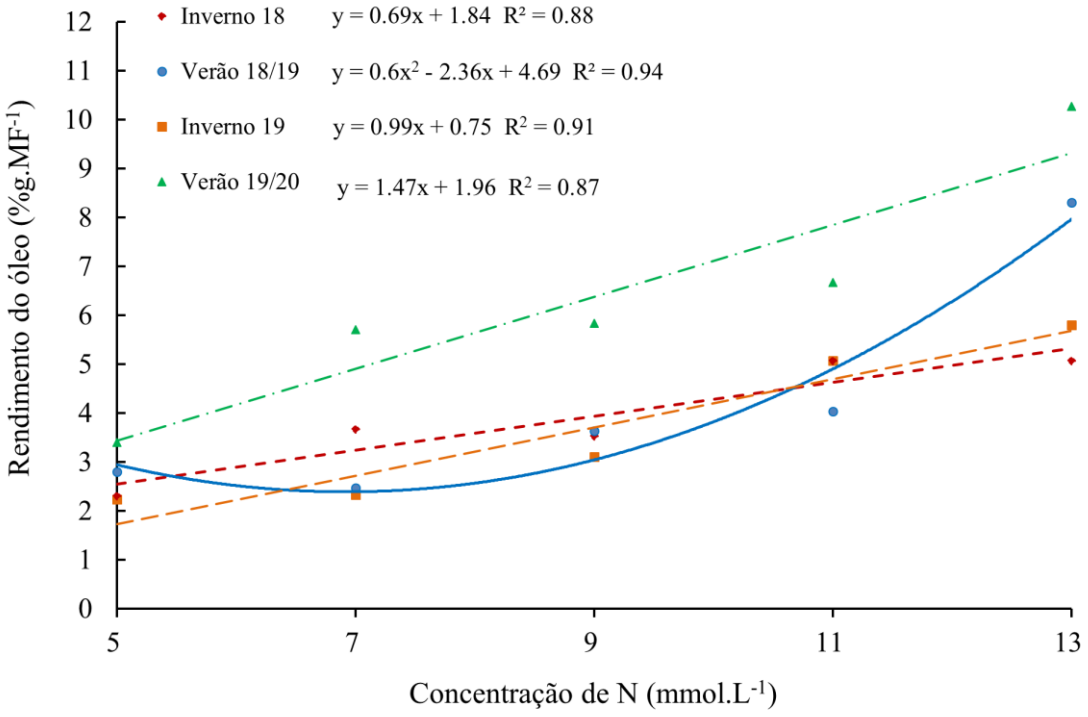
Pode-se dizer que o aporte maior de N fez com que o rendimento aumentasse, mais acentuadamente no verão. Nos dois invernos, os tratamentos 4 e 5 (doses de N = 11 e 13 mmol.L^{-1}, respectivamente) diferiam dos demais, com maior ROE. No verão 2018/19, o tratamento 5 foi o que apresentou maior ROE, diferindo dos demais. Já no verão 2019/20, os tratamentos 2, 3 e 4 não diferiram entre sim, porém, diferiram do tratamento 1 e, também, do tratamento 5, que novamente foi o que obteve o maior rendimento.

No verão 2018/19, o ROE do tratamento 5 (8,3 %g.MF^{-1}) foi 63,7%, superior que o mesmo tratamento 5 (5,07 %g.MF^{-1}) do inverno 2018. O ROE do tratamento 5 (10,27 %g.MF^{-1}), no verão 2019/20 foi 77% maior que o tratamento 5 (5,80 %g.MF^{-1}) do inverno 2019. Do tratamento 1 (N = 5 mmol.L^{-1}) ao tratamento 5 (N = 13 mmol.L^{-1}) houve um aumento de 196,4% no primeiro experimento de verão (2018/19), no

rendimento do óleo, de 2,80 a 8,30 %g.MF^{-1}, e 202% no segundo verão (2019/20), de 3,40 a 10,27 %g.MF^{-1}.

A Figura 8 mostra a regressão polinomial do rendimento do óleo essencial nas duas épocas de cultivo, com diferentes concentrações de N.

Figura 8 – Rendimento do óleo essencial de plantas de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) cultivadas sob diferentes concentrações de nitrogênio (N) na solução nutritiva e épocas de cultivo (inverno e verão)



Fonte: próprio autor.

Outros autores obtiveram menores rendimentos de óleo essencial de tomilho, de 1,86% (JAKIEMIU et al., 2010) e 1,57% (OZCAN e CHALCHAT, 2004), inferior ao detectado neste estudo, provavelmente por terem usado material vegetal seco. Autores como Sifola e Barbieri (2006) também obtiveram aumento na produção de fitomassa e de rendimento do óleo essencial de *Ocimum basilicum* (manjericão) com adubação nitrogenada.

Em relação ao teor do óleo essencial de tomilho, não houve interação significativa entre os dois fatores analisados: estações de cultivo (inverno e verão) *versus* tratamentos (diferentes concentrações de N na solução nutritiva), ou seja,

não houve diferença significativa entre os tratamentos, apenas havendo diferença entre as médias do teor de OE entre as estações, sendo o inverno 2018 e o verão 2018/19 as estações com maior teor de OE, seguido do verão 2019/20 e, por último, o inverno 2019. Os valores do teor de OE estão discriminados na Tabela 7, a seguir.

Tabela 7 - Valores médios do teor de óleo essencial extraído a partir de plantas de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) frescas congeladas, cultivadas sob diferentes concentrações de nitrogênio (N), nas épocas de inverno e verão

	Inverno 2018	Verão 2018/19	Inverno 2019	Verão 2019/20
Tratamento	Teor OE (%)	Teor OE (%)	Teor OE (%)	Teor OE (%)
1	0,22[a]	0,28[a]	0,18[a]	0,19[a]
2	0,35[b]	0,27[a]	0,13[a]	0,23[a]
3	0,29[a]	0,31[a]	0,17[a]	0,23[a]
4	0,31[b]	0,32[a]	0,25[b]	0,29[a]
5	0,37[b]	0,34[a]	0,30[b]	0,29[a]
Média	0,30[c]	0,30[c]	0,21[a]	0,25[b*]

T1 = Concentração de N na solução nutritiva de 5 mmol.L^{-1}, T2 = 7 mmol.L^{-1}, T3 = 9 mmol.L^{-1}, T4 = 11 mmol.L^{-1} e T5 = 13 mmol.L^{-1}. OE = óleo essencial.
*Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$).
Fonte: próprio autor.

Os teores de OE variaram apenas entre os tratamentos com diferentes doses de nitrogênio durante o inverno, sendo os tratamentos 4 e 5, com maiores doses de nitrogênio (11 e 13 mmol.L^{-1}, respectivamente), os com maior teor de óleo. Já durante o verão, não houve diferença significativa entre os tratamentos com doses diferentes de N e o teor de óleo. Nesse sentido, em temperaturas mais elevadas o teor de óleo não sofreu interferência de diferentes concentrações de N na solução nutritiva. Por outro lado, em temperaturas mais baixas, uma maior concentração de N aumentou o teor de OE nas plantas de tomilho.

Deschamps et al. (2012) concluíram que fontes e doses de nitrogênio não influenciaram significativamente a biomassa de folhas e ramos *Mentha x piperita* L., assim como a produtividade e o teor do óleo essencial, porém, segundo os autores, o nitrogênio inorgânico aplicado nas formas de ureia e sulfato de amônio, pode alterar significativamente a composição do óleo.

A fim de comparar a quantidade de óleo essencial de tomilho em plantas frescas e em plantas secas, na segunda repetição do experimento (inverno 2019 e verão 2019/20) também se extraiu óleo de plantas secas, independentemente das doses de N na solução nutritiva. O rendimento, em porcentagem de gramas por

peso da massa seca (%g.MS^{-1}), foi calculado a partir da extração de 25 g de material seco. Esses dados estão discriminados na Tabela 8, a seguir.

Tabela 8 - Valores médios do rendimento do óleo essencial (ROE) de plantas secas de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) cultivado nas épocas de inverno e verão

Inverno 2019	Verão 2019/20
ROE (%g.MF^{-1})	ROE (%g.MF^{-1})
4,0^{a}	7,5^{b*}

ROE = rendimento do óleo essencial.
*Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$).
Fonte: próprio autor.

É possível observar que o rendimento médio do OE de plantas secas cultivadas no verão (7,5 %g.MF-1) foi 87,5%, maior que o de plantas cultivadas no inverno (4,0 %g.MF-1), isto tem a ver com um maior crescimento vegetativo das plantas quando expostas a temperaturas mais elevadas. Em relação ao teor de OE, não houve diferença significativa nas duas estações, sendo que no inverno 2019 o teor de OE nas plantas secas foi de 1,01% e no verão 2019/20 foi de 1,48%.

Apenas percebe-se uma grande diferença em relação ao teor de OE extraído de plantas frescas e de plantas secas. A média de teor de OE de plantas frescas no inverno foi de 0,26% e no verão de 0,27%. Assim, o teor de OE em plantas secas é mais ou menos quatro vezes maior que em plantas frescas, independente da estação, inverno (1,01%) ou verão (1,48%).

Usai et al. (2011), testando diferentes métodos de secagem, verificaram que esses não influenciaram a composição química do óleo essencial de tomilho. Rocha et al. (2012) verificaram que a secagem das plantas não afetou o teor de timol quando comparado com o da planta *in natura*.

4.3 CITOGENOTOXICIDADE DOS EXTRATOS AQUOSOS

A análise de potenciais efeitos prejudiciais do uso de extratos de plantas medicinais merece especial atenção, visto que há, ainda, uma parcela das plantas utilizadas na medicina popular, cuja constituição química é desconhecida, e isto

associado ao consumo indiscriminado de chás ou derivados, os quais podem provocar danos à saúde, ao invés de benefícios.

Os resultados das análises das células meristemáticas de pontas de raízes de *A. cepa* submetidas aos extratos aquosos de tomilho estão discriminados na Tabela 9, onde se observa um efeito citogenotóxico dos extratos.

Tabela 9 - Número de células meristemáticas de *Allium cepa* (cebola) analisadas nos diferentes tratamentos com extratos aquosos de *Thymus vulgaris* L. (tomilho) e seus respectivos índices mitóticos e índices genotóxicos, incluindo células em interfase, em divisão e com alterações cromossômicas

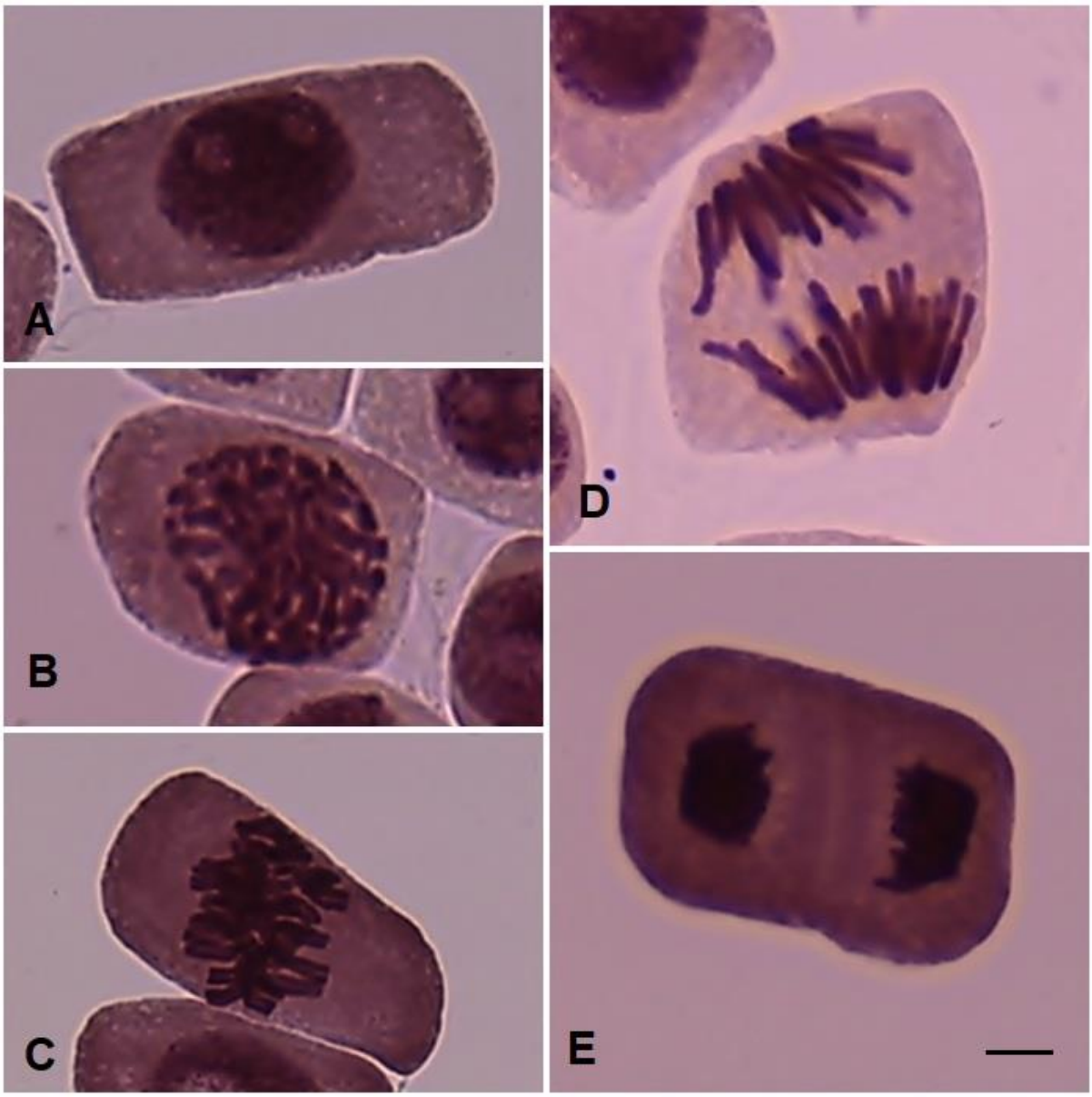
Tratamentos	Total de células analisadas	Células em interfase	Células em divisão	Células com alterações cromossômicas	IM (%)	IG (%)
CN	4000	3804	196	0	4.90[a]*	0[d]*
CP	4000	3850	149	88	3.73[b]	2.20[a]
EAF6I	4000	3847	153	36	3.83[b]	0.90[b]
EAF6V	4000	3843	157	24	3.93[b]	0.60[c]
EAF12I	4000	3888	111	15	2.78[c]	0.38[d]
EAF12V	4000	3930	70	7	1.75[d]	0.18[d]
EAS6I	4000	3884	115	15	2.88[c]	0.38[d]
EAS6V	4000	3821	179	22	4.48[a]	0.55[c]
EAS12I	4000	3935	62	9	1.55[d]	0.23[d]
EAS12V	4000	3943	58	5	1.45[d]	0.13[d]

CN = controle negativo (água destilada); CP = controle positivo (glifosato 2%); EAF6I = extrato aquoso de 6 $g.L^{-1}$– infusão de plantas de tomilho frescas congeladas coletadas no inverno; EAF6V **=** extrato aquoso de 6 $g.L^{-1}$ – infusão de plantas de tomilho frescas congeladas coletadas no verão; EAF12I = extrato aquoso de 12 $g.L^{-1}$ – infusão de plantas de tomilho frescas congeladas coletadas no inverno; EAF12V = extrato aquoso de 12 $g.L^{-1}$ – infusão de plantas de tomilho frescas congeladas coletadas no verão; EAS6I = extrato aquoso de 6 $g.L^{-1}$ – infusão de plantas de tomilho secas coletadas no inverno; EAS6V = extrato aquoso de 6 $g.L^{-1}$ – infusão de plantas de tomilho secas coletadas no verão; EAS12I = extrato aquoso de 12 $g.L^{-1}$ – infusão de plantas de tomilho secas coletadas no inverno; EAS12V = extrato aquoso de 12 $g.L^{-1}$ – infusão de plantas de tomilho secas coletadas no verão. IM = índice mitótico. IG = índice genotóxico.
*Valores seguidos por letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).
Fonte: próprio autor.

Todos os extratos aquosos de tomilho exibiram atividade antiproliferativa, uma vez que esses reduziram o IM em relação ao CN. Os tratamentos com os extratos aquosos nas maiores concentrações (EAF12I, EAF12V, EAS12I e EAS12V), tanto de folhas frescas congeladas, como de folhas secas e independente da época de colheita, foram os que mais inibiram a divisão celular, com ênfase nos extratos aquosos na concentração de 12$g.L^{-1}$ de folhas frescas do verão (EAF12V) e secas (EAS12I e EAS12V) que apresentaram os menores valores de IM, que não diferiram estatisticamente entre si (IM = 1,75%, 1,55% e 1,45%, respectivamente).

A Figura 9 ilustra algumas células meristemáticas de pontas de raízes de cebola visualizadas durante a análise das lâminas.

Figura 9 – Fases da divisão celular observadas em células meristemáticas de raízes de cebola (*Allium cepa*) tratadas com extratos aquosos de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), visualizadas em microscópio óptico



A) Interfase; B) Prófase; C) Metáfase; D) Anáfase e E) Telófase. Escala: 10µm.
Fonte: próprio autor.

Diversos autores também relataram atividade antiproliferativa em extratos aquosos de plantas medicinais, analisados pelo teste de *A. cepa*, como: *Pterocaulon polystachyum* DC. (KNOLL et al., 2006), *Luehea divaricata* Martius (FRESCURA et

al., 2012), *Mentha pulegium* L. (TEDESCO et al., 2012), *Peltodon longipes* Kunth. ex Benth. (KUHN, et al., 2015) e *Echinodorus grandiflorus* (Cham & Schltdl.) Micheli (COELHO et al., 2017).

Outros estudos demonstraram potencial dos extratos aquosos de tomilho para prevenir ou reverter alterações induzidas pelo paracetamol em ratos, através da sua atividade antioxidante (ABD EL-KADER e MOHAMED, 2012). Ademais, é válido destacar que a presença de substâncias antiproliferativas, capazes de inibir a divisão celular, são de grande interesse, pois podem participar de estudos mais avançados sobre o bloqueio de células tumorais, bem como de processos antienvelhecimento celular.

Em relação à genotoxicidade, o glifosato (CP), como esperado, além de diminuir a divisão celular de pontas de raízes de *A. cepa*, também provocou muitas alterações cromossômicas no decorrer da divisão celular, como demostrado pelo seu elevado IG (2,2%). Também foram encontradas irregularidades cromossômicas, tais como fragmentos de cromossomos, pontes, metáfases desorganizadas e micronúcleos, em todos os tratamentos com os extratos aquosos do tomilho, demonstrando sua atividade genotóxica. Os tratamentos com maiores números de alterações foram os de extratos aquosos nas menores concentrações (6 $g.L^{-1}$), sendo o tratamento EAF6I com maior efeito genotóxico (IG = 0,90%).

Da mesma maneira, outro estudo demonstrou efeito citotóxico e, também, genotóxico do extrato aquosos de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.), sobre sementes de cebola (SOUZA et al., 2005). Utilizando alface como organismo alvo, Sousa et al. (2010) também mostraram atividade citogenotóxica de extratos aquosos de folhas *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (capim-limão), chamando a atenção para o uso dessa espécie, que embora tenha efeitos benéficos como planta medicinal, podem ser observados sérios danos às células pelo uso incorreto.

No geral, o que mais diferiu entre os tratamentos, tanto para o IM como o IG, foi a concentração dos extratos aquosos, e não se esses eram de plantas frescas ou secas.

4.4 CITOGENOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL

Os resultados da análise das células meristemáticas de pontas de raízes de *A. cepa* submetidas aos tratamentos com óleo essencial de tomilho estão relacionados na Tabela 10.

Tabela 10 - Número de células meristemáticas de *Allium cepa* (cebola) analisadas nos diferentes tratamentos com óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. (tomilho) e seus respectivos índices mitóticos e índices genotóxicos, incluindo células em interfase, em divisão celular e com irregularidades

Tratamentos	Total de células analisadas	Células em interfase	Células em divisão	Células com alterações cromossômicas	IM (%)	IG (%)
CN	4000	3802	198	0	4.95[a]	0[b]*
CNE	4000	3807	191	29	4.78[a]	0.73[a]
CP	4000	3876	122	47	3.05[b]	1.18[a]
OE010I	4000	3817	183	40	4.58[a]	1.00[a]
OE010V	4000	3819	180	43	4.50[a]	1.08[a]
OE025I	4000	3847	149	41	3.73[b]	1.03[a]
OE025V	4000	3804	195	46	4.88[a]	1.15[a]

CN = controle negativo; CNE = controle negativo em etanol absoluto; CP = controle positivo; OE010I = óleo essencial (0,10%) – extraído de plantas de tomilho frescas congeladas coletadas no inverno; OE010V = óleo essencial (0,10%) – extraído de plantas de tomilho frescas congeladas coletadas no verão; OE025I = óleo essencial (0,25%) - extraído de plantas de tomilho frescas congeladas coletadas no inverno; OE025V = óleo essencial (0,25%) - extraído de plantas de tomilho frescas congeladas coletadas no verão. IM = índice mitótico. IG = índice genotóxico.
*Valores seguidos por letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).
Fonte: próprio autor.

Observa-se que apenas o tratamento com o OE diluído a 0,25% de plantas cultivadas no inverno (OE025I) apresentou atividade citotóxica antiproliferativa, diferindo estatisticamente dos controles negativos (CN e CNE). Apesar dos demais tratamentos terem reduzido o número de células em divisão celular, essa redução da proliferação não diferiu significativamente em relação aos controles negativos. Nesse sentido, somente o tratamento com o óleo essencial na maior concentração teve efeito citotóxico sobre as células de raízes de *A. cepa*.

Alves et al. (2004) testaram OE de *Lippia sidoides* Cham. (Alecrim-pimenta) na germinação de sementes de *Lactuca sativa* e observaram que havia efeito citotóxico inibitório, sendo o timol o principal componente presente nesse óleo (MARCO et al., 2012). O timol também já se mostrou ativo contra as bactérias *Salmonella* e *Staphylococcus* (DAUQAN e ABDULLAH, 2017). Também foi

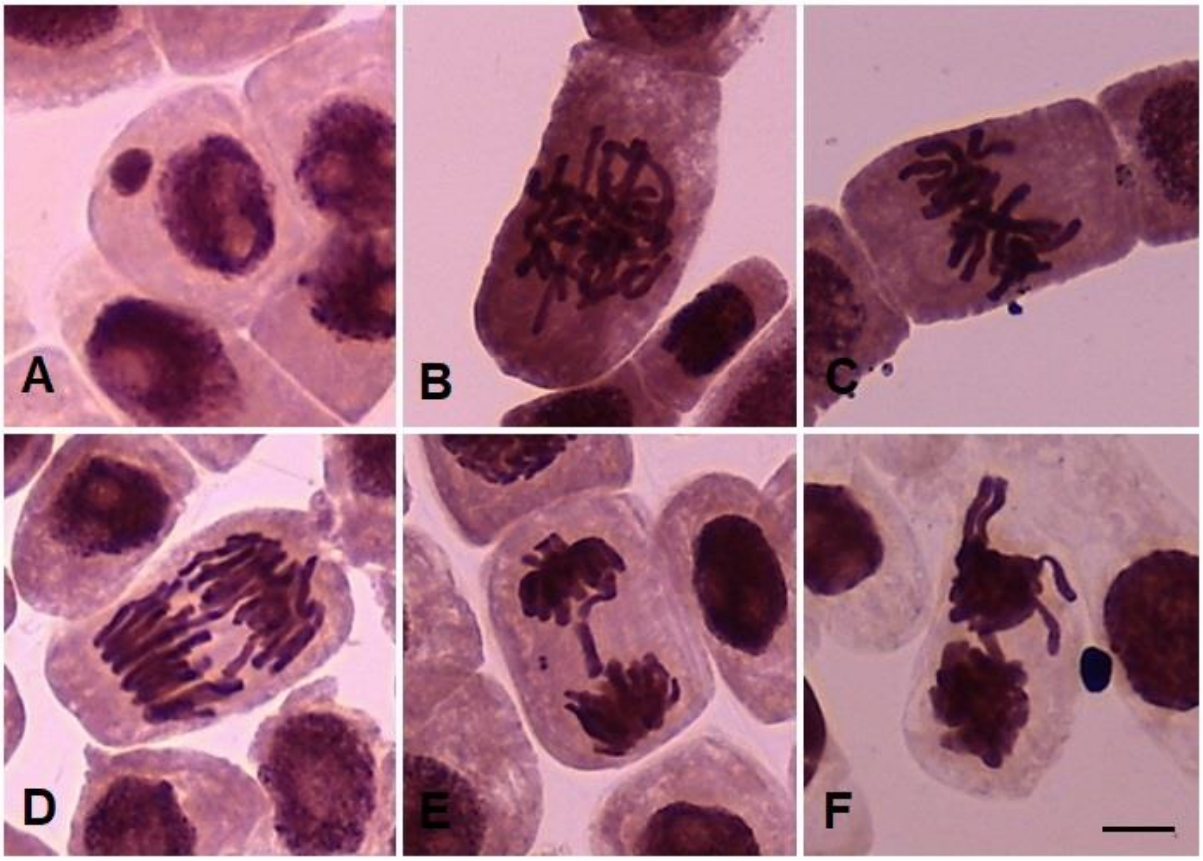
demonstrado o potencial antifúngico do óleo essencial de tomilho pela inibição total do crescimento do micélio de *Fusarium graminearum* (ALEXA et al., 2018). AAZZA et al. (2014) atribuem a atividade antiproliferativa aos monoterpenos, timol e carvacrol, que estão predominantemente presentes no OE de tomilho.

Estudos anteriores também já demonstraram que o OE de *T. vulgaris* apresenta atividade anti-inflamatória (FACHINI-QUEIROZ et al. 2012; RIELLA et al., 2012), a qual pode ser atribuída principalmente ao seu composto principal, ao timol (ABDELLI et al., 2017) e ao carvacrol (TAMAS-KRUMPE et al., 2020). Além disso, compostos minoritários, como p-cimeno e linalol, também podem contribuir para a atividade anti-inflamatória (ZHONG et al., 2012).

Em relação à genotoxicidade, foram encontradas alterações cromossômicas em todos os tratamentos, exceto o controle negativo (T1). Todos os tratamentos com o OE e os controles CNE e CP, não diferiram entre si, entretanto, todos diferiram estatisticamente do controle negativo em água destilada (CN). Ou seja, os tratamentos com o OE – independente da concentração e da estação climática testada – além de diferir do CN em água, não diferiram do CN em etanol (diluidor do óleo) e igualmente não diferiram do CP com o glifosato, que é uma substância sabida causadora de mutações. Nesse sentido, apesar das alterações cromossômicas encontradas terem sido em baixo número, em média de 1% das células analisadas, é possível afirmar que o OE de tomilho é genotóxico.

Com base nos resultados, confirmou-se o efeito genotóxico do glifosato através da indução de alterações cromossômicas e da redução da divisão celular em relação ao controle negativo (água destilada). As alterações cromossômicas encontradas no controle negativo em etanol têm relação com a desnaturação ou modificação de proteínas fundamentais na síntese de DNA (RIEGER e MICHAELIS, 1960). A Figura 10 ilustra algumas alterações cromossômicas encontradas na análise das lâminas.

Figura 10 – Alterações cromossômicas visualizadas em células meristemáticas de raízes de cebola (*Allium cepa*) tratadas com óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)



A) Micronúcleo; B) Metáfase desorganizada; C) Metáfase com cromossomo perdido; D) Ponte anafásica; E) Anáfase com cromossomo perdido e micronúcleo; F) Ponte na telófase. Escala: 10µm. Fonte: próprio autor.

Esses dois compostos demonstraram efeito clastogênico sobre células meristemáticas de *L. sativa* (ALVES et al., 2018). O timol também se mostrou ativo contra bactérias dos gêneros *Salmonella* e *Staphylococcus* (DAUQAN; ABDULLAH, 2017).

Estudos realizados por Alves et al. (2018) revelaram que o carvacrol, nas concentrações de 0,75 e 1,5 mmol.L^{-1}, induziu alterações cromossômicas em células meristemáticas de *L. sativa*, apresentando um mecanismo clastogênico (quando micronúcleos são formados por fragmentos cromossômicos acêntricos), ou seja, causando danos ao DNA, mas não atuando na formação do fuso mitótico. Os mesmos autores também observaram que o timol, apesar de reduzir o IM, também apresentou efeito genotóxico, apresentando ação clastogênica e aneugênica (quando cromossomos inteiros não completam a migração anafásica da divisão

celular), promovendo danos ao DNA e ao fuso mitótico. No mesmo sentido, Pinheiro et al. (2015) também verificaram um aumento das alterações em células meristemáticas de raiz de *L. sativa* tratadas com carvacrol, em comparação com herbicidas sintéticos e água, acompanhada de redução do IM. Kubatka et al. (2019), em estudo *in vitro,* revelaram os efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos dos óleos essenciais de *T. vulgaris* em células de carcinoma mamário.

A análise dos componentes bioativos presentes nos OE é dificultada pela sua complexidade química, tanto qualitativa, como quantitativamente. Na literatura, normalmente o constituinte majoritário é nomeado como o responsável pela atividade biológica, porém, autores como Burt (2004) e Bakkali et al. (2008) lembram que essa pode ser resultado do antagonismo ou sinergismo de vários componentes.

Portanto, estudos utilizando *A. cepa* como organismo-alvo, devido à sua alta sensibilidade, comprovam ser um sistema apropriado e confiável para detectar fitotoxicidade de aleloquímicos presentes em extratos aquosos e óleos essenciais de plantas de interesse na área da medicina popular.

4.5 ANÁLISE FITOQUÍMICA

4.5.1. Determinação dos compostos fenólicos dos extratos aquosos por UPLC-DAD

A análise por UPLC-DAD permitiu a identificação de ácido gálico ($C_7H_6O_5$), em comprimento de onda de detecção de 250 nm, na amostra de extrato aquoso de plantas de tomilho seco cultivado no verão (PSV), conforme descrito na Tabela 11. A equação linear e o r^2 obtidos para a curva analítica de ácido gálico foram y = 5027,1x – 3,3243 e r^2 = 0,99, respectivamente. A concentração média de ácido gálico ($mg.g^{-1}$ de extrato ± desvio padrão médio, DPM) detectada nas amostras de PSV foi de 2,01 ± 0,11 ($mg.g^{-1}$ de extrato) e o tempo de retenção médio (min ± DPM) deste fitoconstituinte nestas amostras foi de 1,28 ± 0,01. Os demais padrões não puderam ser detectados nas amostras utilizando este método cromatográfico.

Tabela 11 - Tempo de retenção (minutos), área do pico de ácido gálico e concentração de ácido gálico (mg.g-1 de extrato) em extrato aquoso de plantas secas de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) cultivadas no verão, com detecção em 250 nm

Repetição	Tempo de retenção (min)	Área do pico de ácido gálico	Ácido gálico ($mg.g^{-1}$ de extrato)	Concentração média de ácido gálico ($mg.g^{-1}$ de extrato) ± DPM
1	1,275	6,28446	1,9114	2,01 ± 0,11
2	1,286	6,63393	1,9810	
3	1,282	7,40406	2,1341	

DPM: desvio padrão médio
Fonte: próprio autor.

O ácido gálico é um composto fenólico e já teve evidenciado efeitos como: antimicrobiano, antimalárico, anti-inflamatório, antitumoral e neuroprotetor (KASTURE et al., 2009).

Szilvássy et al., (2013) encontraram o ácido rosmarínico como o componente principal em extratos aquosos de tomilho seco. Além disso, outros estudos identificaram a presença, além de ácido rosmarínico, também do ácido cafeico, do ácido p-cumárico, do ácido gerânico, do ácido p-hidroxibenzóico, do ácido gentísico, do ácido singárico e do ácido ferúlico (KUETE, 2017).

4.5.2. Determinação da composição química do óleo essencial por CG-EM

Em relação à qualidade do óleo essencial, a Tabela 12 ilustra os resultados encontrados por CG, discriminando os compostos químicos encontrados no OE extraído de plantas de tomilho frescas congeladas cultivadas no inverno de 2018 e no verão 2018/2019. A análise das amostras do inverno conseguiu detectar 94,10% dos componentes presentes no óleo, sendo o timol a substância mais abundante, com 52,41%. Os demais compostos em maior quantidade foram: γ-terpineno (17,57%), *β*-cimeno (9,26%), *β*-cariofileno (2,93%) e carvacrol (2,57%).

A análise das amostras de verão detectou 95,99% dos elementos que compõem o OE de tomilho, sendo o timol, novamente, a substância predominante, com 45,94%. Os demais componentes predominantes diferiram apenas pela presença de *α*-terpineno, entre os cinco mais abundantes, a saber: γ-terpineno (23,04%), *β*-cimeno (8,35%), *α*-terpineno (2,86%) e carvacrol (2,65%).

Tabela 12 - Composição química obtida por cromatografia gasosa do óleo essencial de plantas frescas congeladas de *Thymus vulgaris* L. (tomilho) cultivadas em estufa durante o inverno e o verão

Componente	KI_C	KI_L	% inverno	% verão
α-Tujeno	924	930	0.58[1]	1.50[1*]
α-Pineno	931	934	0.34[1]	0.72[1]
Benzaldeído	959	958	0.16[1]	0.34[1]
Sabineno	975	974	0.65[1]	2.33[1]
β-Mirceno	989	988	0.28[1]	0.39[1]
α-Felandreno	1004	1001	-	0.12[1]
α-Terpineno	1015	1015	1.77[1]	2.86[1]
β-Cimeno	1023	1022	9.26[1]	8.35[1]
Limoneno	1027	1027	0.99[1]	1.16[1]
Eucaliptol	1030	1031	0.14[1]	0.22[1]
γ-Terpineno	1057	1060	17.57[1]	23.04[1]
Biciclo [3.1.0] hexan-2-ol, 2-metil-5-(1-metiletil)-, (1α,2α,5α)-	1069	1069	0.21[1]	0.22[1]
β-Linalol	1099	1099	1.75[1]	1.43[1]
Cânfora	1145	1145	0.71[1]	-
Borneol	1170	1172	0.55[1]	0.74[1]
1-Terpinen-4-ol	1179	1178	0.10[1]	0.11[1]
α-Terpineol	1193	1190	-	0.10[1]
Éter metil timílico	1237	1236	0.31[1]	0.46[1]
Timol	1289	1290	52.41[2]	45.94[2]
Carvacrol	1296	1296	2.57[1]	2.65[1]
Acetato de timol	1344	1349	0.29[1]	0.32[1]
β-Cariofileno	1418	1418	2.93[1]	2.32[1]
Geranil propionato	1468	1473	-	0.14[1]
Germacreno D	1479	1480	0.29[1]	0.42[1]
δ-Cadineno	1516	1515	0.23[1]	-
γ-Cadineno	1511	1510	-	0.21[1]
τ-Cadinol	1640	1640	-	0.10[1]
TOTAL			**94.10%**	**95.99%**

KI_C: índice de kovats calculado; KI_L: índice de kovats da literatura (NIST, 2008).
*Agrupamento pelo método de Tocher.
Fonte: próprio autor.

Estudos anteriores já demonstraram a predominância do timol no OE de tomilho (AKSEL, 2008; SHARANGI e GUHA, 2013; DAUQAN e ABDULLAH, 2017), seguido de carvacrol, *p*-cimeno, γ-terpineno (JAKIEMIU et al., 2010; BORUGĂ et al., 2014; FATIMAH, 2014).

O timol, que também é um isômero do carvacrol, é um monoterpeno fenol natural, incolor e com odor característico (ESCOBAR et al., 2020). Por serem

isômeros, se o timol está presente em alta concentração no óleo, a quantidade de carvacrol é baixa, e vice-versa. Componentes fenólicos, como timol e carvacrol, podem inibir várias bactérias patogênicas (Edris, 2007), sendo que OE ricos nesses compostos são bastante utilizados na produção de cremes dentais e enxaguantes bucais.

O Óleo essencial de tomilho com alta quantidade de timol é considerado de ótima qualidade. Segundo a norma ISO 19817 (2017), a quantidade de timol no OE de tomilho deve ser entre 35 e 55%. Assim, o OE de tomilho extraído nas condições aqui testadas fornecem um óleo de excelente qualidade.

5 CONCLUSÃO

O nitrogênio, acrescentado à solução nutritiva, promove um aumento do crescimento vegetativo das plantas de tomilho apenas quando a temperatura é elevada. A maior quantidade de massa fresca de plantas de tomilho ocasiona um maior rendimento nas extrações de óleo essencial. Em relação ao teor de óleo em temperaturas mais elevadas, não há interferência de diferentes concentrações de N na solução nutritiva. Por outro lado, em temperaturas mais baixas, maiores concentrações de N aumentam o teor de OE nas plantas de tomilho. Ainda, o cultivo de tomilho em diferentes estações não influencia na composição química do óleo essencial.

Os extratos aquosos de tomilho, tanto de plantas frescas, como de plantas secas, apresentam efeito citotóxico, ou seja, demonstram ação antiproliferativa, reduzindo a divisão celular, principalmente em maiores concentrações (12 $g.L^{-1}$). Além disso, os extratos aquosos demonstram efeito genotóxico, especialmente na menor concentração (6 $g.L^{-1}$), verificado pelas alterações cromossômicas visualizadas no teste de *A. cepa*.

Reforça-se, que há a presença de ácido gálico em extratos aquosos de tomilho seco cultivado no verão. Dessa forma, o óleo essencial de tomilho, cujo composto majoritário é o timol, apresenta potencial citotóxico na maior concentração (0,25%) e genotóxico nas duas concentrações testadas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Evidentemente que entender como os fatores abióticos influenciam na produção de plantas medicinais é de grande importância na busca por condições ótimas de crescimento a campo, juntamente com uma qualidade máxima em relação aos compostos bioativos de interesse medicinal. Assim sendo, indica-se o uso de maior quantidade de N, o qual é responsável pelo aumento da massa verde de plantas, de onde o óleo essencial é obtido, aumentando, assim, seu rendimento. O aumento da temperatura também foi responsável pelo maior crescimento vegetativo das plantas de tomilho. Em relação à quantificação dos compostos bioativos, o timol continuou sendo o composto majoritário do óleo essencial, independente das condições de nutrição e das temperaturas testadas, mantendo sua excelente qualidade.

O consumo de tomilho como planta medicinal deve ser moderado e em baixas concentrações, pois este estudo mostra que os extratos aquosos da planta apresentam atividade antiproliferativa. A capacidade antiproliferativa parece estar relacionada às substâncias antioxidantes, as quais provavelmente estão envolvidas em processos de antienvelhecimento celular.

Um potencial efeito genotóxico foi evidenciado nos extratos aquosos e no óleo essencial de tomilho. Essa característica pode servir como bioindicadora para futuros estudos que levem em consideração sua capacidade de induzir alterações cromossômicas, as quais são capazes de provocar a morte celular, especificidade essa, importante nos campos de pesquisas para drogas anticarcinogênica e, também, no campo da agricultura, onde poderia ser testado como ingrediente ativo em bioherbicidas.

Os compostos secundários, presentes nos extratos aquosos e no óleo essencial, variam consideravelmente, tanto em quantidade, como em qualidade, de acordo com vários fatores, provavelmente influenciando o seu valor terapêutico. No Rio Grande do Sul, onde ocorre uma clara distinção entre as estações do ano, as plantas de tomilho cultivadas no inverno e no verão tiveram diferenças, principalmente na quantidade de óleo extraído, pois no verão houve um maior rendimento, uma vez que as plantas apresentaram um maior crescimento vegetativo nessa estação. Em relação à qualidade do óleo, essa foi excelente, pois o timol foi o

composto majoritário nas duas estações, sendo encontrado em maior quantidade no inverno. Com relação aos demais constituintes, não foram encontradas diferenças estatísticas, sendo todos os demais constituintes considerados do grupo de compostos minoritários.

Os resultados aqui encontrados indicam que a produção de tomilho em estufa, utilizando substrato como meio para fixação das plantas e fertirrigação, traz ótimos benefícios, principalmente com temperatura elevada, com média acima de 20 ºC, promovendo um maior crescimento vegetativo, e, consequentemente, um aumento no rendimento do óleo essencial. Nessas condições, a qualidade do óleo essencial é excelente, com o timol representando praticamente metade da composição do óleo essencial.

E quanto ao consumo pela população em geral, recomenda-se cautela, uma vez que tanto os extratos aquosos, como o óleo essencial do tomilho apresentam efeitos citogenotóxicos nos testes preliminares, que podem ou não serem confirmados em estudos mais avançados. Por outro lado, estes potenciais de citogenotoxicidade são desejáveis quando se trata da indústria farmacêutica e de produtos para a agricultura.

REFERÊNCIAS

AAZZA, S. et al. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of moroccan commercial essential oils. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 4, p. 587-594, 2014.

ABD EL-KADER, M. A.; MOHAMED, N. Z. Evaluation of protective and antioxidant activity of thyme (T*hymus vulgaris*) extract on paracetamol-induced toxicity in rats. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 6, n. 7, p. 467-474, 2012.

ABDELLI, W. et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of algerian *Thymus vulgaris* essential oil. **Natural Product Communications**, v. 12, n. 4, p. 611-614, 2017.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2009. 804 p.

AGREN, G.I.; FRANKLIN, O. Root: shoot ratios, optimization and nitrogen productivity. **Annals of Botany**, v. 92, n. 6, p. 795-800, 2003.

AKSEL, B. **Bioactive compounds in plants**: benefits and risks for man and animals. The Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo. Symposium 13-14th November 2008.

ALEXA, E. et al. Synergistic antifungal, allelopatic and anti-proliferative potential of *Salvia officinalis* L., and *Thymus vulgaris* L. essential oils. **Molecules**, v. 23, n.1, p.185-200, 2018.

ALLIED MARKET RESEARCH, 2020. Essential Oils Market by Product (Orange, Eucalyptus, Cornmint, Peppermint, Citronella, Lemon, Lime, Clove, Spearmint, and Others) and Application (Food and Beverages, Medical, Cleaning and Home, Spa and Relaxation and Others): Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2019–2026. Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com/essential-oils-market>. Acesso em: 28 abr. 2020.

ALMEIDA, M. Z. Plantas medicinais: abordagem histórico-contemporânea. In: **Plantas Medicinais** [online]. 3 ed. Salvador: EDUFBA, 2011, p. 34-66. Disponível em: < https://books.scielo.org/id/xf7vy>. Acesso em: 27 abr. 2021.

ALVES, M. C. S. et al. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 11, 1083-1086, 2004.

ALVES, T. A. et al. Toxicity of thymol, carvacrol and their respective phenoxyacetic acids in *Lactuca sativa* and *Sorghum bicolor*. **Industrial Crops & Products**, v. 114, p. 59-67, 2018.

ALVES, M. S. et al. Efficacy of lemongrass essential oil and citral in controlling *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae), a post-harvest cowpea insect pest. **Crop Protection**, v. 119, p. 191-196, 2019.

AMARAL, W. et al. Desenvolvimento, rendimento e composição de óleo essencial de camomila [*Chamomila recutita* (L.) Rauschert] sob adubação orgânica e mineral. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 10, n. 4, p. 1-8, 2008.

AMARAL, W. et al. Desenvolvimento da camomila, rendimento e qualidade do óleo essencial em diferentes idades de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 2, p. 237-242, 2014.

AMARAL, L. P. et al. Variabilidad de la composición química del aceite esencial de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 14, n. 3, p.190-205, 2015.

ANDRIOLO, J. L. **Fisiologia das culturas protegidas**. Santa Maria: UFSM, 1999. 142 p.

ANDRIOLO, J. L. **Olericultura geral**. Santa Maria: UFSM, 2017. 93 p.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 10, de 9 de março de 2010**. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária e dá outras providências. Brasília, 2010.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 26, de 13 de maio de 2014**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Brasília, 2014.

ARNOLD, C. Y. Maximum-minimum temperature as a basis for computing heat units. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.76, p.682-692, 1960.

ASBAGHIAN, S. et al. Comparison of volatile constituents, and antioxidant and antibacterial activities of the essential oils of *Thymus caucasicus*, *T. kotschyanus* and *T. vulgaris*. **Natural Products Communications**, v. 6, n. 1, p. 137–140, 2011.

ASKARI, M. et al. Water stress and manure application affect the quantity and quality of essential oil of *Thymus daenensis* and *Thymus vulgaris*. **Industrial Crops & Products**, v. 111, p.336-344, 2018.

AYRES, M. et al. **BioEstat**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Belém: ONG Mamiraua, 2007, 364p.

AZAMBUJA, W. **Óleo essencial de tomilho**. Disponível em: https://www.oleosessenciais.org/oleo-essencial-de-tomilho/. Acesso em: 30 ago. 2021.

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

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARANAUSKIENÉ, R. et al. Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*). **Journal of Agricultural Science and Food Chemistry**, v. 51, p. 7751−7758, 2003.

BARBIERI, C.; BORSOTTO, P. Essential Oils: Market and Legislation. In. EL-SHEMY, H. A. (Ed.). **Potential of Essential Oils**. Rijeka: InTech, 2018. Cap. 6, p. 107–127. Disponível em:< https://www.intechopen.com/books/potential-of-essential-oils/essential-oils-market-and-legislation>. Acesso em: 28 abr. 2020.

BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BLANCO, M. C. S. G.; SILVA, S. M. P da. Panorama e perspectivas da cadeia produtiva de plantas medicinais e aromáticas. **Casa da Agricultura**, v. 16, p. 7-8, 2013.

BOFF, B. S. et al. Investigação da presença de efedrinas em *Ephedra tweediana* Fisch & C.A. Meyer e em *E. triandra* Tul. (Ephedraceae) coletadas em Porto Alegre/RS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n.3, p. 394-401, 2008.

BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L. Importance of HPLC in Analysis of Plants Extracts. **Austin Chromatography**, v. 1, n. 3, p. 2, 2014.

BORUGĂ, O. et al. *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. **Journal of Medicine and Life**, v. 7, n. 3, p. 56-60, 2014.

BONCIU, E. et al. An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. **Caryologia**, v. 71, n. 3, p. 191-209, 2018.

BRANDÃO, M. G. L. Importância dos registros históricos na investigação e utilização de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O., et al. (Org.). **Farmacognosia**: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 29-37.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006**. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Brasília, 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006**. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria Interministerial nº 2.960, de 9 de dezembro de 2008**. Aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 702, de 21 de março de 2018**. Altera a Portaria de Consolidação nº 2/GM/MS, de 28 de setembro de 2017, para incluir novas práticas na Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares - PNPIC. Brasília, 2018.

BRISKIN, D. P. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant Physiology**, v. 124, p.507-514, 2000.

BURT, S. Essencial oils: their antibacteriological properties and potencial applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CARVALHO, A. C. B et al. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. T&C Amazônia, ano V, n. 11, 2007.

CARVALHO, L. M.; COSTA, J. A. M. da; CARNELOSSI, M. A. G. **Qualidade em plantas medicinais**. Documentos 162. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2010. 54 p.

CARVALHO, L. M. **Orientações Técnicas para o Cultivo de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares**. Circular Técnica nº 70. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2015. 11p.

CASTRO, H.G. et al. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais:** metabólitos secundários. 2 ed. Viçosa: UFV, 2004. 113p.

CASTRO, M. R.; FIGUEIREDO, F. F. Saberes tradicionais, biodiversidade, práticas integrativas e complementares: o uso de plantas medicinais no SUS. **Hygeia**, v. 15, n. 31, p. 56-70, 2019.

COELHO, A. P. D. et al. Genotoxic and antiproliferative potential of extracts of *Echinodorus grandifloras* and *Sagittaria montevidensis* (Alismataceae). **Caryologia**, v. 70, n. 1, p. 82-91, 2017.

ComTrade - COMMODITY TRADE STATISTICS DATABASE. **United Nations Statistics Division**. Disponível em: <http://data.un.org/Data.aspx?d=ComTrade&f=_l1Code%3a34%3brtCode%3a76%3byr%3a2018&c=2,3,5,7,8,9,11,12&s=_crEngNameOrderBy:asc,yr:desc,_l2Code:asc&v=1>. Acesso em: 02 ago. 2021.

CORRÊA JUNIOR, C.; SCHEFFER, M. C. **Boas Práticas Agrícolas (BPA) de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Curitiba: Instituto Emater, 2013. 52 p.

CORRÊA JUNIOR, C.; SCHEFFER, M. C. As plantas medicinais, aromáticas e condimentares e a agricultura familiar. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 3, 2014.

COSTA, E. L. N.; SILVA, R. F. P.; FIÚZA, L. M. Efeitos, aplicações e limitação de extratos de plantas inseticidas. **Acta Biológica Leopoldensia**, v. 26, n. 2, p. 173-185, 2004.

COSTA, A. G.; FERRAZ, E. O.; DESCHAMPS, C.; PINTO, J. E. B. P. Desenvolvimento vegetativo do patchouli após a aplicação de diferentes níveis de nitrogênio em plantio e pós-colheita. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p. S3428-S3433, 2010.

CRUZ, C. D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

CUNHA, A. P. Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes ativos e fitoterapia. ESALQ/USP, 2005. Base de dados.

DAUQAN, E. M. A.; ABDULLAH, A. Medicinal and functional values of thyme (*Thymus vulgaris* L.) Herb. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 17-22, 2017.

DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M. Plantas Medicinais, Fármacos Derivados de Plantas. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 1326p.

DESCHAMPS, C. et al. Produção de biomassa, teor e composição do óleo essencial de *Mentha x piperita* L. em resposta a fontes e doses de nitrogênio. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.14, n.1, p.12-17, 2012.

DUDAREVA, N. et al. Plant volatiles: Recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.25, p.417- 440, 2006.

EHSANIPOUR, A.; RAZMJOO, J.; ZEINALI, H. Effect of nitrogen rates on yield and quality of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) accessions. **Industrial Crops and Products**, v. 35, p. 121-125, 2012.

EREN, Y.; ÖZATA, A. Determination of mutagenic and cytotoxic effects of *Limonium globuliferum* aqueous extracts by *Allium*, Ames, and MTT tests. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 51-59, 2014.

EKOH, S. et al. Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effect of spices (*Thymus vulgaris*, *Murraya koenigii*, *Ocimum gratissimum* and *Piper guineense*) in alloxaninduced diabetic rats. **International Journal of Biosciences**, v. 4, n. 2, p. 179-187, 2014.

EVARISTO, I. M.; LEITÃO, M. C. Identificação e quantificação por DAD-HPLC, da fracção fenólica contida em folhas de *Quercus suber* L. **Silva Lusitana**, v. 9, n. 2, p. 135-141, 2001.

FACHINI-QUEIROZ, F.C. et al. Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris L*. essential oil, on the inflammatory response. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, e657026, 2012.

FAN, X. H., et al. Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, p. 217-224, 2006.

FARIAS, J. G., et al. Chemical properties and protective effect of *Rosmarinus officinalis*: Mitigation of lipid peroxidation and DNA-damage from arsenic exposure. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 91, p. 1-7, 2018.

FATIMAH, A. A. Chemical composition, antioxidant and antitumor activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 21, n. 10, p. 1670-1676, 2014.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

FERNANDES, S. D. C. Plantas medicinais: risco e toxicidade. In: SANTOS, J. S.; ALMEIDA, C. C. O. F. **Das plantas medicinais à fitoterapia**: uma ciência em expansão (Orgs.). Brasília: Editora IFB, 2016, p. 65-71.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542014000200001&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 21 mai. 2019.

FIALHO, R. O.; PAPA, M. F. S.; PEREIRA, D. A. S. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Phakopsora euvitis*, agente causal da ferrugem da videira. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 1-7, 2015.

FIGUEIREDO, F. F. A agenda político-ambiental no Brasil. **Revista Espaço Acadêmico**, v. 18, p. 106-115, 2018.

FIORI, A. C. G. et al. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, v. 148, n. 7/8, p. 483-487, 2000.

FISKESJÖ, G. *Allium* test. In: O'HARE, S., ATTERWILL, C. K. (Eds). In vitro toxicity testing protocols. Series - methods in molecular biology™, vol 43. **Humana Press**. 1995. Cap. 14, p. 119-127.

FRANSCESCON, F. et al. Protective role of jaboticaba *Plinia peruviana* peel extract in copper-induced cytotoxicity in *Allium cepa*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 35322-35329, 2018.

FREITAS, S. M. **A Saúde no Brasil**: do descobrimento aos dias atuais. São Paulo: INDHS, 2014. 182p.

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

FRESCURA, V.D. **Parâmetro fitoquímicos, genotóxicos e de crescimento de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em diferentes salinidades e doses de nitrogênio**. 2014. 111p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Área de concentração em Produção Vegetal - Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

FRESCURA, V. D. et al. Nutrient solution concentration and collection time in phytomass production, content, yield and chemical composition of essential oil of Rosemary. **Journal of Plant Nutrition**, v. 41, n. 10, p. 1293-1302, 2018.

GILMORE, J. R. E. C.; ROGERS, J. S. Heat units as a method of measuring maturity in corn. **Agronomy Journal**, v. 50, n. 10, p. 611-615, 1958.

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

GOLPARVAR, A. R.; BAHAR, B. Effects of phenological stages on herbage yield and quality/quantity of oil in garden thyme (*Thymus vulgaris* L.). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 25, p. 6085-6089, 2011.

GROSSMAN, L. **Óleos essenciais**: na culinária, cosmética e saúde. São Paulo: Optionline, 2005, 154p.

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

HECK, R. M.; MARCHI, M. M. As plantas e o cuidado da saúde no Bioma Pampa. In: HECK, R. M.; RIBEIRO, M. V.; BARBIERI, R. L. (Ed.) **Plantas medicinais do Bioma Pampa no cuidado em saúde**. Distrito Federal: Embrapa, 2017. p. 76-99.

HEINZMANN, B. M.; SPITZER, V.; SIMÕES, C. M. O. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O., et al. (Org.). **Farmacognosia**: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 167-184.

HISTER, C. A. L. et al. Evaluation of the antiproliferative effect of infusions and essential oil of *Aloysia gratissima*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 12, n. 24, p. 1581-1584, 2009.

HISTER, C. A. L. et al. Determinação de compostos fenólicos e avaliação do potencial genotóxico e antiproliferativo de extratos aquosos das folhas de *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae). **Caderno de Pesquisa. Série biologia (UNISC)**, v. 31, p. 17-30, 2019.

HOSSAIN, K. L. et al. Effect of different nitrogen and potassium rates on agronomic characters of *Aloe indica*. **Indonesian Journal of Agronomy**, v. 35, n. 1, p. 58-62, 2007.

HOSSEINZADEH, S. et al. The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: a review of *Thymus vulgaris*. **International Journal of Clinical Medicine**, v. 6, n. 9, p. 635-642, 2015.

HUFFMAN, M. A. Current evidence for self-medication in primates: A multidisciplinary perspective. **Yearbook Physical Anthrop**, v. 40, p. 171–200, 1997.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Industrial Anual. Tabela 7752 - Produção e vendas dos produtos e/ou serviços industriais, segundo as classes de atividades e os produtos - Prodlists Indústria 2016 e 2019. Disponível em: < https://sidra.ibge.gov.br/tabela/7752#resultado>. Acesso em: 20 ago. 2021.

IPEK, E., et al. Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames *Salmonella*/microsomal test. **Food Chemistry**, v. 93, n. 3, p. 551–556, 2005.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 45-66, 2006.

ISO (International Organization for Standardization) **19817:2017**. Essential oil of thyme [*Thymus vulgaris* L. and *Thymus zygis* L.], thymol type. 7p. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/66267.html>. Acesso em: 07 set. 2021.

JAKIEMIU, E. A. R. et al. Estudo da composição e do rendimento do óleo essencial de tomilho *Thymus vulgaris* L. **Semina**, v. 31, n. 3, p. 683-688, 2010.

JAMSHIDI-KIA, F.; LORIGOOINI, Z.; AMINI-KHOEI, H. Medicinal plants: Past history and future perspective. **Journal of Herbmed Pharmacology**, v. 7, n.1, p. 1-7, 2018.

JAVED, H. et al. An overview on medicinal importance of *Thymus vulgaris***. Journal of Asian Scientific Research**, v. 3, n. 10, p. 974-982, 2013.

JERKOVIĆ, I.; MASTELIĆ, J.; MILOŠ, M. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 36, n. 6, p. 649-654, 2001.

JUDD, W. S. et al. **Sistemática vegetal**: um enfoque filogenético. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 630p.

KAGALE, S. et al. Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. oryzae. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 65, n. 2, p. 91-100, 2004.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 10, p. 813-829, 2003.

KANDIL, M. A. et al. Herbal and essential oil yield of Genovese basil (*Ocimum basilicum* L.) grown with mineral and organic fertilizer sources in Egypt. **Journal fur Kulturpflanzen**, v. 61, n. 12, p. 443-449, 2009.

KARAGOZLÜ, N.; ERGONÜL, B.; OZCAN, D. Determinacion of antimicrobial effect of mint and basil essential oils on survival of *E. coli* 0157:H7 and typhimurium in freshcut lettuce and purslane. **Food Control**, v. 22, p. 1851-1855, 2011.

KASTURE, V. S. et al. Antioxidant and antiparkinson activity of gallic acid derivatives. Pharmacology Online, v. 1, p. 385-395, 2009.

KIM, S.-I. et al. Toxicity and repellency of origanum essential oil and its components against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) adults. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 13, n. 4, p. 369-373, 2010.

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

KUETE, V. *Thymus vulgaris*. In: KUETE, V. (Ed.) **Medicinal spices and vegetables from Africa**: therapeutic potential against metabolic, inflammatory, infectious and systemic diseases. Dschang, Camarões: Academic Press, 2017. p. 599-609.

KUHN, A. W. et al. Genotoxic and chromatographic analyses of aqueous extracts of *Peltodon longipes* Kunth. ex Benth. (hortelã-do-campo). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 3, p. 533-540, 2015.

KUTCHAN, T. M. Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba. **Plant Physiology**, v. 125, p. 58-62, 2001.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, n 4, p. 471–486, 1938.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

MARCO, C. A. et al. Chemical composition and allelopathyc activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, n. 1, p. 157-160, 2012.

MARINHO-PRADO, J. S.; MORAIS, L. A. S.; PAZIANOTTO, R. A. A. **Efeito deletério de óleos essenciais sobre *Anticarsia gemmatalis* e *Helicoverpa armigera***. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2019. 25p.

MARTINEZ, H. E. P. **Hidroponia**. Viçosa: Editora Aprenda Fácil, 2006. 271p.

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

MEDEIROS, M. F. T. **Etnobotânica histórica**: princípios e procedimentos. Recife: NUPEEA, 2009. 84p.

MELO, F. R. Plantas medicinais: aspectos bioquímicos. In: SANTOS, J. S.; ALMEIDA, C. C. O. F. (Org.). **Das plantas medicinais à fitoterapia**: uma ciência em expansão. Brasília: Editora IFB, 2016. p. 73-140.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Análise comparativa do potencial alelopático do óleo essencial de *Thymus vulgaris* e seu constituinte majoritário na germinação e vigor de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.). **E-xacta**, v. 8, n. 2, p. 45-53. 2015.

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

MORAIS, L. A. S. Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds). **Biocontrole de doenças de plantas**: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009b. Cap. 9, p. 139-152.

MORAIS, L. A. S. de; MARINHO-PRADO, J. S. Plantas com Atividade Inseticida. In: HALFELD-VIEIRA, B. de A.et al. **Defensivos agrícolas naturais**: uso e perspectivas. Brasília: Embrapa, 2016. Cap. 19, p. 542-593.

MORTENSEN, L. M. The effect of air temperature on growth of eight herb species. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 1542-1546, 2014.

MOTOYAMA, M. M. et al. Efeito antimicrobiano de extrato cítrico sobre *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis. **Acta Scientiarum**, v. 25, n. 2, p. 509-512, 2003.

NATU, K. N.; TATKE, P. A. Essential oils – prospective candidates for antifungal treatment? **Journal of Essential Oil Research**, v. 31, n. 5, P. 347-360, 2019.

NELLICKAPPILLY, S. Science, religion and ethics: the religious ethical basis of indian science of medicine. **Acta Bioethica**, v. 16, n. 1, p. 31-39, 2010.

NIST. **NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library & Search Program**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009.

NOLKEMPER, S. et al. Antiviral Effect of Aqueous Extracts from Species of the *Lamiaceae* Family against *Herpes simplex* Virus Type 1 and Type 2 *in vitro*. **Planta Medica**, v. 72, n. 15, p. 1378-1382, 2006.

NOWAK, A. et al. The effects of thyme (*Thymus vulgaris*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils on *Brochothrix thermosphacta* and on the shelf life of beef packaged in high-oxygen modified atmosphere. **Food Microbiology**, v. 32, n. 1, p 212-216, 2012.

OBSERVATORY OF ECONOMIC COMPLEXITY (OEC), 2017. Disponível em: < https://oec.world/en/profile/hs92/3301/>. Acesso em: 28 abr. 2020.

OKOH, O.O. et al. The effects of drying on the chemical components of essential oils of *Calendula officinalis* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 10, p. 1500-1502, 2008.

OUEDRAOGO, M., et al. Review of current and “omics” methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 492-512, 2012.

OZCAN, M.; CHALCHAT, J. Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, v. 30, n. 3/4, p. 68-73, 2004.

PAL, J.; ADHIKARI, R. S.; NEGI, J. S. Effect of nitrogen, phosphorus and potassium on growth and green herb yield of *Thymus serphyllum*. **International Journal of Current Microbiology Applied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 406-410, 2016.

PALMIERI, M. J. et al. Cytogenotoxic effects of spent pot liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*. **Water Air Soil Pollution**, v. 227, n.5, p. 156, 2016,

PANIZZA, S. **Plantas que curam (cheiro do mato)**. 3.ed. São Paulo: IBRASA, 1998. 279p.

PASQUALLI, M. **Potencial antiproliferativo, antigenotóxico e análise fitoquímica dos extratos aquosos e do óleo de *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae)**. 2016. 47p. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

PATIL, S. M. et al. A systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacological aspects of *Thymus vulgaris* Linn. **Heliyon**, v. 7, n. 5, e07054, 2021.

PERES, L. E. P. Metabolismo Secundário. Piracicaba, SP: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), 2004. 26p.

PINHEIRO, P. F. et al. Phytotoxicity and cytotoxicity of essential oil from leaves of *Plectranthus amboinicus*, carvacrol, and thymol in plant bioassays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 41, p. 8981-8990, 2015.

PINHEIRO, S. M. G. **Concentração e composição da solução nutritiva na produção e citogenotoxicidade do óleo essencial da *Salvia officinalis* L**. 2019. 77p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2019.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.

PRASANTH REDDY, V. et al. Review on *Thymus vulgaris* traditional uses and pharmacological properties. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 3, n. 3, p. 164, 2014.

RAI, L. K.; PRASAD, P.; SHARMA, E. Conservation threats to some important medicinal plants of the Sikkin Himalaia. **Biological Conservation**, v. 93, n. 1, p. 27-33, 2000.

RAVEN, P. H; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. 850p.

REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J.T. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. **Annual Review of Entomology**, v. 57, p.405-424, 2012.

RIEGER, R.; MICHAELIS, A. Chromosomen aberrationen nach Einwirkung von Acetaldehyd auf Primärwurzeln von Vicia faba. **Biologisches Zentralblatt**, v. 79, p. 1-5, 1960.

RIELLA, K.R. et al. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from Lippia gracilis, in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 656-663, 2012.

ROCHA, F. A. G. et al. O uso terapêutico da flora na história mundial. **HOLOS**, v. 1, p. 49-61, 2015.

ROCHA, R. P. et al. Influência do processo de secagem sobre os principais componentes químicos do óleo essencial de tomilho. **Revista Ceres**, v. 59, n. 5, p. 731-737, 2012.

ROSA, N. F. F.; GIACOMELLI, S. R. Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares: uma alternativa de inclusão social produtiva para a agricultura familiar. COTRIM, D. (Org.) **Desenvolvimento rural e agricultura familiar**: produção acadêmica da Ascar. Porto Alegre: EMATER-Ascar, 2014. Cap. XXVII, p. 560-577.

ROTA, M.C. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, v. 19, n. 7, p. 681-687, 2008.

SAAD, B. Greco-Arab and Islamic Herbal Medicine: A Review. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 4, n. 3, p. 249-258, 2014.

SAITO, M. L. **As plantas praguicidas: alternativa para o controle de pragas na agricultura**. Embrapa Meio Ambiente, v. 12, n. 47, p. 1-3, 2004.

SALEHI, S.; GOLPARVAR, A.R.; HADIPANAH, A. Effect of harvest time on yield and quality of *Thymus vulgaris* L. essential oil in Isfahan Province, Iran. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 79, n. 2, p. 115-118, 2014.

SANTOS, J. S. Plantas medicinais: uma ciência em expansão. In: SANTOS, J. S.; ALMEIDA, C. C. O. F. (Orgs.). **Das plantas medicinais à fitoterapia**: uma ciência em expansão. Brasília: Editora IFB, 2016. Cap. 1, p. 11-24.

SANTURIO, D. F. et al. Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Thyme and of Thymol against Escherichia coli Strains. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, p. 1-4, 2014.

SATYAL, P. et al. Essential oil characterization of Thymus vulgaris from various geographical locations. **Foods**, v. 5, n. 70, p. 1-12, 2016.

SCARFATO, P. et al. Synthesis and characterization of polyurea microcapsules containing essential oils with antigerminative activity. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 105, n. 6, p. 3568-3577, 2007.

SCHMIDT, E. et al. Chemical Composition, Olfactory Analysis and Antibacterial Activity of *Thymus vulgaris* Chemotypes Geraniol, 4-Thujanol/Terpinen-4-ol, Thymol and Linalool Cultivated in Southern France. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 8, p. 1095-1098, 2012.

SCHWAMBACH, C.; CARDOSO SOBRINHO, G. **Fisiologia Vegetal**: introdução às características, funcionamento e estruturas das plantes e interação com a natureza. São Paulo: Érica, 2014. 192p.

SCOLLARD, J.; McMANAMOM, O.; SCHMALENBERGER, A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth on fresh cut produce with thyme essential oil and essential oil compound verbenone. **Postharvest Biology and Technology**, v. 120p. 61-68, 2016.

SENAR (Serviço Nacional de Aprendizagem Rural). **Plantas medicinais aromáticas e condimentares: produção e beneficiamento**. Coleção SENAR 213. Brasília: SENAR, 2017. 124p.

SHAABAN, H. A. E.; EL-GHORAB, A. H. SHIBAMOTO, T. Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 2, p. 203-212, 2012.

SHARANGI, A. B.; GUHA, S. Wonders of leafy spices: medicinal properties ensuring human health. **Science International**, v. 1, n. 9, p. 312-317, 2013.

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

SILVA, E. M. Plantas medicinais: fitocosmética. In: SANTOS, J. S.; ALMEIDA, C. C. O. F. (Org.). **Das plantas medicinais à fitoterapia**: uma ciência em expansão. Brasília: Editora IFB, 2016. p. 141-162.

SILVA, P. S. S. Atuação dos aleloquímicos no organismo vegetal e formas de utilização da alelopatia na agronomia. **Revista Biotemas**, v.25, n.3, 2012.

SILVA, R. **Crescimento e teor de óleo essencial de *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton (Verbenaceae), em função da adubação orgânica, sazonalidade, horário**

de colheita e processamento pós-colheita. 2005. 66p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto alegre/ Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 2004. Cap. 18, p. 467-495.

SIVROPOULOU, A. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1202-1205, 1996.

SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA. Óleos essenciais: uma fonte de divisas a ser mais explorada no Brasil. Disponível em: < https://www.sna.agr.br/oleos-essenciais-uma-fonte-de-divisas-a-ser-mais-explorada-no-brasil-2/>, Acesso em: 21 mai. 2020.

SOUSA, S. M.; SILVA, P. S.; VICCINI, L. F. Cytogenotoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemon grass) aqueous extracts in vegetal test systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 2, p. 305-311, 2010.

SOUZA, S. A. M. et al. Atividade alelopática e citotóxica do extrato aquoso de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss.). **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 11 n. 3/4, p. 7-14, 2005.

STAHL, B. E.; VENSKUTONIS, R. P. Thyme. In: PETER, K.V. (Ed.). **Handbook of Herbs and Spices**. 2 ed. London: Woodhead Publishing, 2012, p. 499-525.

SZILVÁSSY, B. et al. Polyphenols in the aqueous extracts of garden thyme (*Thymus vulgaris*) chemotypes cultivated in Hungary. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 5, p. 605-608, 2013.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia vegetal**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 858 p.

TAMAS-KRUMPE, O. et al. Medicinal properties of *Thymus vulgaris* essential oil: a review. **Lucrări Ştiinţifice Seria Medicină Veterinară**, v. 63, n. 2, p. 129-135, 2020.

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

TEDESCO, S. B.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D. 2012. Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test. In: SRIVASTAVA, J. K. (Ed.). **Environmental Contamination**. Rijeka: InTech, 2012. Cap. 8, p. 137–156. Disponível em:<https://www.intechopen.com/ books/environmental-contamination/bioindicator-ofgenotoxicity-the-allium-cepa-test>. Acesso em: 11 mai. 2019.

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

THOMPSON, J.D. et al. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, p. 859-880, 2003.

TOLEDO, A. C. O. et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

TRAPP, K. C. et al. Determination of phenolic compounds and evaluation of cytotoxicity in *Plectranthus barbatus* using the *Allium cepa* test. **Caryologia**, v. 73, p. 143-153, 2020.

USAI, M. et al. Influence of different stabilizing operations and storage time on the composition of essential oil of thyme (*Thymus officinalis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Food Science and Technology**, v. 44, p. 244-249, 2011.

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

VEIGA JUNIOR, V. F.; MELLO, J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognonia**, v. 18, n. 3, p. 464-471, 2008.

VERPOORTE, R.; CONTIN, A.; MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Phytochemistry Reviews**, v. 1, p.13-25, 2002.

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

VIEIRA, R. F.; CAMILLO, J.; CORADIN, L. (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial**. Brasília: MMA, 2016. 1.160 p.

VIEIRA, L. F. A; SILVEIRA, G. L. Cyto(geno)toxic endpoints assessed via cell cycle bioassays in plant models. In: ÇELIK, T.A. (Ed.). **Cytotoxicity**. Rijeka: InTech, 2018. Cap. 7, p. 117–129. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/cytotoxicity/cyto-geno-toxic-endpoints-assessed-via-cell-cycle-bioassays-in-plant-modelst>. Acesso em: 11 mai. 2019.

XYLIA, P. et al. Potential aplication of spearmint and lavender essential oils for assuring endive quality and safety. **Crop Protection**, v. 102, p. 94-103, 2017.

YAMAURA, T.; TANAKA, S.; TABATA, M. Light-dependent formation of glandular trichomes and monoterpenes in thyme seedlings. **Phytochemistry**, v. 28, n. 3, p. 741-744, 1989.

WANG, W. H. et al. Evaluation of the antioxidant activity and antiproliferative effect of the jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) seed extracts in oral carcinoma cells. **BioMed Research International**, v. 2014, n. 6, p. 1-7, 2014.

WEI, A.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant/lipoxygenase Inhibitory Activities and Chemical Compositions of Selected Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 12, p. 7218-7225. 2010.

WHO (World Health Organization). Traditional medicine strategy 2002-2005. Geneva: WHO, 2002. 74p. Disponível em: <https://www.who.int/medicines/publications/traditionalpolicy/en/>. Acesso em: 30 mar. 2020.

WHO (World Health Organization). **WHO global report on traditional and complementary medicine 2019**. Geneva: WHO, 2019. 228p. Disponível em: <https://www.who.int/publications-detail/who-global-report-on-traditional-and-complementary-medicine-2019>. Acesso em: 24 mar. 2020.

WOLFFENBÜTTEL, A. N. **Base da química dos óleos essenciais e aromaterapia**: abordagem técnica e científica. Belo Horizonte: Editora Lazlo, 2019. 494p.

ZHONG, W. et al. p-Cymene modulates *in vitro* and *in vivo* cytokine production by inhibiting MAPK and NF-κB activation. **Inflammation**, v. 36, p. 529-537, 2012.