

# Avaliação do potencial antiproliferativo e alelopático do óleo essencial de alecrim sobre bioindicador vegetal

## Evaluation of the antiproliferative and allelopathic potential of rosemary essential oil on vegetal bioindicator

**SANTOS, JESSICA EL KOURY**

Pós graduação em Ciências Ambientais  
Universidade Federal de Pelotas, RS BRAZIL  
jessicaeksantos@hotmail.com

**FREITAG, ROGÉRIO ANTONIO**

Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais  
Centro de Ciências Químicas Farmacêuticas e de Alimentos  
Universidade Federal de Pelotas, RS BRAZIL  
raf.organica@gmail.com

**BOBROWSKI, VERA LUCIA**

Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética,  
Instituto de Biologia  
Universidade Federal de Pelotas, RS BRAZIL  
vera.bobrowski@ufpel.edu.br \*

**Abstract**— Rosemary essential oil is commonly used as a condiment in cooking and in folk medicine, but knowledge of the aspects of the biological activity of the vegetable and its healing or toxic potential is essential for the transformation of the medicinal plant into the herbal product. The objective of this study was to evaluate the allelopathic, phytotoxic, cytotoxic and genotoxic potentials of rosemary essential oil on seeds of *Lactuca sativa* L. (lettuce) as a bioindicator. The biological assays used chemical-free (Feltrin®) seeds, which were subjected to the effect of rosemary essential oil in direct contact and to the effect of oil solution volatility. For use, the oil was emulsified with Tween 80 a 5% v / v and dissolved in distilled water to obtain the following solutions T3 20mg / L; T4 40mg / L; T5 80mg / L; T6 160mg / L; T7 320mg / L and T8 640mg / L and distilled water (T1) and Tween 80 at 5% v / v (T2) were used as negative control. The physiological effect on initial and final germination, shoot and root length, as well as the cytotoxic and genotoxic effects were evaluated by observing the mitotic division and the mitotic (IM), metaphase (IMet) and anaphasic (IAf) and chromosomal abnormalities (ACI). Through analysis of the results of rosemary EO at different concentrations, it was possible to verify inhibitory allelopathic, phytotoxic and cytotoxic activity at the highest concentrations (320 mg / L and 640mg / L) tested in this experiment, with effect. More significant when they were under the effect of the direct contact with rosemary EO experiment. Rosemary essential oil shows allelopathic, phytotoxic and cytotoxic activity at

the highest concentrations tested. In the experiment of lettuce seed contact with EO the effects on germination, growth and mitotic cell division were more severe than when the exposure was only to volatile compounds. Regarding genotoxicity, it is suggested to continue the research to obtain conclusive answers.

**Keywords**—*genotoxicity; cytotoxicity; Rosmarinus officinalis; Biological assays.*

### I. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais têm um importante papel no desenvolvimento de novos medicamentos, não apenas quando os compostos bioativos são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também quando são usados como matéria prima para a síntese de medicamentos ou como base para novos compostos biologicamente ativos [1]. O conhecimento dos aspectos desta atividade biológica do vegetal é essencial para a transformação da planta medicinal no produto fitoterápico [2] Dentre as inúmeras plantas utilizadas como fitoterápicos, têm-se o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), também conhecido como alecrim rosmaninho, alecrim de jardim, alecrim da horta ou erva da graça, uma erva perene nativa da região da Costa do Mar Mediterrâneo [3]. Apresenta efeito antibacteriano [4], antifúngico [5], antiviral [6], antibiofilme [7], antitumoral [8], anti-inflamatório [9], antileishmânico e antioxidante [10] [11] entre outras aplicações [1] [12].

Apesar do Brasil estar em 2º lugar em pesquisas com plantas medicinais, a quantidade de trabalhos ainda é considerada pequena em relação a nossa

biodiversidade [13]. Assim, a descoberta de novas propriedades curativas de plantas é, muitas vezes, dificultada devido às limitações de financiamento para ensaios controlados de identificação destas propriedades e também de efeitos adversos. A autora ainda chama atenção para o aumento dos estudos voltados à avaliação das atividades mutagênica e toxicológica, devido a sua importância em conhecer os efeitos biológicos colaterais das plantas antes que sejam consideradas como agentes terapêuticos, além de estabelecer medidas de controle de uso [13]. Portanto, em função da extensa diversidade de plantas, e da maioria dos fito derivados ainda não terem sido avaliados, quanto à sua eficácia e segurança, a tendência é que essa área de estudo seja ampliada.

Para obter-se compostos biologicamente ativos, primeiramente é necessário obter os extratos da planta e/ou óleos essenciais para realizar uma caracterização fitoquímica. A composição química dos extratos varia dependendo do método e solventes utilizados (metanol, eter, água, acetona, etc.). Os óleos essenciais (OE) são misturas complexas que contém centenas de compostos, voláteis, monoterpênicos, sesquiterpênicos, compostos aromáticos e outros derivados. Os OE podem ser sintetizados por todos os órgãos das plantas, ou seja, brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, madeira ou casca, e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares [14]. Na literatura, diversos estudos realizados in vivo e in vitro já demonstraram as propriedades terapêuticas do alecrim. De uma maneira geral, os óleos voláteis possuem uma variada série de ações biológicas [15], sendo essa uma das justificativas para se aprofundar os estudos sobre óleos. Segundo Andrade et al. (2018) [1], o óleo essencial de alecrim, apresenta como principais constituintes cânfora, 1,8-cineol,  $\alpha$ -pineno, borneol, canfeno,  $\beta$ -pineno e limoneno (1,5-5,0%) em proporções que variam de acordo com o estágio vegetativo, o explante e as condições bioclimáticas. Sabe-se que produtos naturais assim como os sintéticos, exigem o conhecimento do modo de ação dos grupos químicos que possuem para a avaliação das potencialidades terapêuticas, tóxicas e para a formulação de uma estratégia adequada para seu uso [16].

Sistemas testes vegetais têm sido utilizados para estudos preliminares dos possíveis efeitos adversos de produtos químicos, extratos de plantas, misturas complexas, entre outros. Isso permite identificar riscos potenciais aos seres humanos, utilizando como primeira triagem de detecção [17]. Bioensaios vegetais com *Allium cepa*, *Lactuca sativa*, *Zea mays* e *Vicia faba* têm sido usados para avaliação da citogenotoxicidade, devido principalmente ao grande número de sementes produzidas por essas espécies, ao fácil manuseio e a grande superfície de contato proporcionada aos produtos administrados, além disso, essas espécies mostram também alta

sensibilidade e possuem cromossomos grandes, facilitando a visualização citogenética [18][19]. Estes testes têm sido validados por pesquisadores que os realizam conjuntamente aos testes animais *in vivo*, como o teste de micronúcleo, sendo que os resultados obtidos têm sido muito similares [20]. Para que uma planta seja indicada como bioindicador vegetal, a espécie deve apresentar germinação rápida e uniforme, e um grau de sensibilidade que permita expressar os resultados sob baixas concentrações das substâncias alelopáticas [21].

Utilizando a abordagem citogenética, podemos avaliar a citotoxicidade pela análise do índice mitótico e a genotoxicidade pela formação de micronúcleos e alterações cromossômicas. A maioria dos biotestes buscam analisar agentes que possam afetar os níveis fisiológico e molecular do organismo exposto, e devido a universalidade do código genético, se o agente causar danos ao DNA, ele tem potencial citogenotóxico em qualquer tipo de células (animal, vegetal ou microrganismos)[22].

Estudos sobre toxicidade e mutagenicidade são necessários, tanto em extrato/ou óleo essencial de alecrim como de outras espécies medicinais, devido à contribuição ao conhecimento para uma utilização mais eficiente e segura. Dentro deste contexto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar os potenciais alelopático, fitotóxico, citotóxico e genotóxico do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre alface (*Lactuca sativa* L.) como bioindicador.

## II. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de Genética Vegetal (LabGen) do Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética (DEZG), no Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul. Como bioindicador vegetal foram utilizadas sementes de alface da cultivar Americana Grandes Lagos 659, isentas de produtos químicos (Feltrin®), obtidas no comércio local e mantidas a 4°C por no mínimo 72h para superação da dormência. Estas foram submetidas ao efeito do óleo essencial (OE) de alecrim em contato direto (experimento 1) e ao efeito da volatilidade (experimento 2) da solução do óleo. O OE foi extraído de folhas secas de plantas adultas adquiridas comercialmente, por arraste à vapor de água, conforme procedimento realizado no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN) do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA) da Universidade Federal de Pelotas e, em seguida, acondicionado em frascos escuros e mantidos em refrigerador a 5°C até utilização.

A identificação fitoquímica do OE de alecrim foi realizada em um cromatógrafo a gás acoplado a um detector de massas, modelo GC/MS-QP 2010SE (Shimadzu, Japão) equipado com auto injetor AOC-20i do LPPN. A separação dos compostos foi em coluna capilar RTX-5MS (Restek, USA) com dimensões de 30m x 0.25mm x 0.25 $\mu$ m nas seguintes condições cromatográficas temperatura inicial de 40°C subindo a

5°C min<sup>-1</sup> até 280°C, permanecendo nesta temperatura por 10min; volume injetado: 1µL; interface: 280°C; temperatura do injetor: 280°C; gás de arraste: hélio; fluxo linear de gás: 1.27mL min<sup>-1</sup>; split: 1:10; modo scan; faixa de massa 40 a 700 m/z e voltagem do filamento em 70eV. As quantificações foram realizadas por área normalizada e as identificações dos compostos pelo espectro de massas utilizando a biblioteca NIST 8 do GC/MS.

Para utilização nos bioensaios, o OE foi emulsionado com Tween 80 a 5%v/v e dissolvido em água destilada para a obtenção das seguintes soluções: T3 - 20mg/L; T4 - 40mg/L; T5 - 80mg/L; T6 - 160mg/L; T7 - 320mg/L e T8 - 640mg/L. Como controle negativo utilizou-se água destilada (T1) e água + Tween 80 a 5%v/v (T2). Cada tratamento constou de cinco repetições de 50 sementes, as quais foram semeadas em caixa gerbox, com cada caixa representando uma repetição. O substrato utilizado foi papel germiteste, umedecido com quantidade de água destilada ou extrato equivalente a 2.5 vezes a massa do papel seco. No teste do contato direto, 1mL da solução de cada concentração de óleo foi distribuído no papel umedecido com 7mL de água destilada, efetuando se, logo após, a semeadura. Para análise do efeito da volatilidade, após a semeadura, foram adicionados 1mL de cada concentração em bolinhas de algodão (de aproximadamente 0.5cm de diâmetro) colocadas ao centro de cada gerbox e o papel germiteste foi umedecido com 7mL de água destilada. Em ambos os experimentos (contato e volatilidade), as caixas gerbox foram mantidas em câmara de germinação com temperatura controlada de 25 ± 1°C e fotoperíodo de 12h. As caixas gerbox foram dispostas na câmara de forma aleatória por sorteio. Durante o período do experimento realizou-se o monitoramento da umidade do papel germiteste, por observação visual, e quando necessário, adicionados 2mL de água destilada.

As variáveis analisadas para verificação do efeito alelopático do OE foram germinação inicial, aos quatro dias após a semeadura, e germinação final, aos sete dias, conforme as regras para análise de sementes-RAS [23]. Consideraram-se germinadas as sementes que apresentaram protrusão da radícula com igual tamanho da semente.

O efeito fitotóxico foi avaliado através da medida em milímetros do comprimento da parte aérea e das raízes de dez plântulas selecionadas ao acaso de cada repetição/tratamento, com o auxílio de régua milimetrada.

Para avaliar a citotoxicidade do OE nas diferentes concentrações analisou-se o seu efeito sobre a divisão celular, sendo as variáveis analisadas os índices mitótico (IM), metafásico (IMet) e anafásico (IAna), e o efeito genotóxico pela análise das anormalidades cromossômicas (IAC). Para tanto, dez raízes de cada repetição/tratamento foram coletadas aleatoriamente aos quatro dias após a semeadura, fixadas em Carnoy (3:1 - etanol: ácido acético glacial) e mantidas em

freezer até a análise. Para proceder a análise das lâminas, foi utilizada a técnica de esmagamento [24], sendo as pontas das raízes lavadas em água destilada, hidrolisadas em HCl 5N durante dez minutos, e lavadas novamente em água destilada e então coradas com orceína acética 2%. Para cada tratamento foram analisadas dez lâminas e observadas 500 células/lâmina pela técnica de varredura no aumento de 400x, totalizando 5000 células/tratamento.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, e os dados foram submetidos a análise da normalidade residual, atendendo às pressuposições. Também foi realizada a análise de variância e para comparação das médias foi aplicado o teste de múltiplas comparações de Tukey a 5% de probabilidade de erro utilizando o programa Statistix9® e utilizou-se o Microsoft Excel® para elaboração dos gráficos.

### III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### A. Composição química do óleo essencial

Na Tabela I são apresentadas as porcentagens dos constituintes químicos do óleo essencial de alecrim. Foram identificados dez compostos sendo o componente majoritário o Eucalyptol ou 1-8-cineol (pico 6) com 51.83%, o segundo composto presente em maior quantidade foi o d-camphor (pico 8) com 17.08%, o terceiro composto foi o α-Pinene (pico 1) com 12.11%, o quarto composto foi o Camphene (pico 2) com 4.52%, o quinto composto foi o Borneol (pico 9) com 4.37%, o sexto composto foi o α-terpineol (pico 10) com 3.25%, o sétimo composto foi o o-Cymol (pico 5) com 2.90%, o oitavo composto foi o β-Pinene (pico 3) com 1.64%, o penúltimo composto foi o Linallol (pico 7) com 1.20% e o último composto identificado foi o β-Myrcene (pico 4) com 1.10%.

Estes dados são similares aos observados por Andrade et al. (2018) [1] que relatam que os principais constituintes do óleo essencial de alecrim são cânfora (5.0% a 21%), 1,8-cineol (15–55%), α-pineno (9.0–26%), borneol (1.5–5.0%), canfeno (2.5–12%), β-pineno (2.0–9.0%) e limoneno (1.5-5.0%) em proporções que variam de acordo com o estágio vegetativo e as condições bioclimáticas. Composições similares também foram citadas por Nieto, Ros e Castillo (2018)[24] e Wang et al. (2012)[25]. Segundo Andrade et al. (2018)[1], as atividades biológicas de *R. officinalis* L. têm sido atribuídas a dois grupos de compostos: uma fração volátil e compostos fenólicos. Os autores ainda destacam que nos últimos 20 anos o alecrim tem sido mais estudado principalmente por suas propriedades anticâncer, antioxidante e anti-infecciosa (55% dos estudos).

De acordo com Peron et al. (2008) [16], além de conhecer os princípios ativos presentes, é importante entender o seu modo de ação para a avaliação das potencialidades terapêuticas, tóxicas e para a formulação de uma estratégia adequada para seu uso como planta medicinal.

TABELA I-CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM UTILIZADO NOS EXPERIMENTOS DE CONTATO E VOLATILIDADE UTILIZANDO BIOINDICADOR ALFACE.

Pico	R.Time	Área %	Nome
1	6.499	12.11	$\alpha$ -Pinene
2	6.860	4.52	Camphene
3	7.598	1.64	$\beta$ -Pinene
4	7.992	1.10	$\beta$ -Myrcene
5	8.966	2.90	o-Cymol
6	9.197	51.83	1,8-cineol
7	11.074	1.20	Linallol
8	12.421	17.08	d-camphor
9	13.014	4.37	Borneol
10	13.708	3.25	$\alpha$ -terpineol

Fonte: Laboratório de Lipidômica e Bio-orgânico do CCQFA/ UFPel, Pelotas, RS.

### B. Efeito alelopático

No experimento 1 (de contato), a germinação inicial sofreu uma redução drástica em todas as concentrações do OE de alecrim testadas. Porém, ao avaliarmos a germinação aos sete dias após a semeadura, observamos que as concentrações de 40 e 80 mg/L não influenciaram de forma estatisticamente significativa a germinação quando comparados com os controles negativos. Mas as concentrações de 20 e 160 mg/mL diferiram estatisticamente dos controles. As maiores concentrações, 320 e 640mg/L, inibiram totalmente a germinação, o que afetou as demais variáveis analisadas nestes tratamentos (Fig.1).

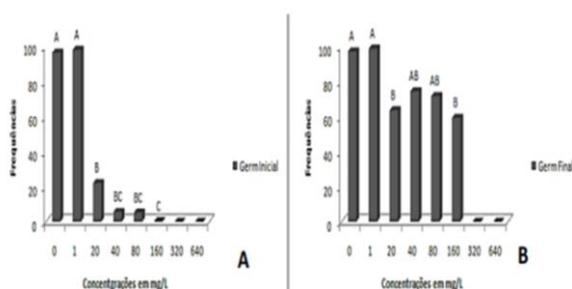


Fig. 1. Análises de germinação inicial (A) e final (B) de sementes de alface, do experimento do efeito de contato do óleo essencial de alecrim (*R. officinalis* L.).

No experimento 2 (volátil), a germinação inicial sofreu uma redução significativa, conforme o aumento da concentração do óleo de alecrim, com exceção para a de 160mg/L, que não diferiu dos controles. Na análise da germinação final, apenas a concentração de 640 mg/L diferiu estatisticamente dos controles (Fig. 2).

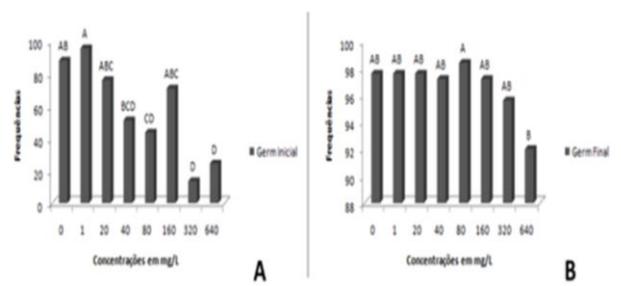


Fig. 2. Gráficos referente às análises de germinação inicial e final de sementes de alface do experimento de volatilidade do óleo essencial de alecrim (*R. officinalis* L.).

Weir, Park e Vivanco (2004) [27] sugerem que dois mecanismos principais podem estar envolvidos nessa redução da germinação, o primeiro, a paralisação da respiração mitocondrial e o segundo, a perturbação de enzimas do ciclo de Krebs, já que durante a germinação das sementes há um rápido aumento na atividade glicolítica ligado a um aumento da taxa de respiração. Podesta e Plaxon (1994) [28] ressaltam que a atividade glicolítica é necessária para mobilizar os carboidratos armazenados, fornecer a semente poder redutor, ATP e produtos de carbono necessário para a biossíntese das raízes e parte aérea das plântulas emergentes, se o processo de respiração é comprometido, conseqüentemente a germinação é afetada.

### C. Efeito fitotóxico

Avaliando o efeito fitotóxico, pela análise do crescimento, observamos pelos dados obtidos no experimento 1, que o desenvolvimento da parte aérea (PA) e da parte radicular (PR) foi fortemente afetado pelo OE de alecrim, pois a partir da concentração de 20mg/L, houve uma redução acentuada e estatisticamente significativa. Entretanto, observando os dados da PR, nota-se que esta não foi tão afetada, pois não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações testadas. Nas concentrações de 320 e de 640mg/L, não houve germinação das sementes (Fig. 3).

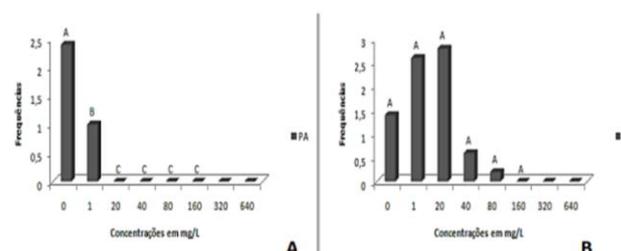


Fig. 3. Análise do crescimento da parte aérea (A) e da parte radicular (B) de plântulas de alface do experimento do efeito de contato do óleo essencial de alecrim (*R. officinalis* L.).

Caputo et al. (2018) [29] avaliaram o efeito de contato do OE de alecrim sobre a germinação e alongamento da raiz de rabanete, arruda e alface, e observaram que o OE influencia de diferentes maneiras o alongamento radicular de *Raphanus sativus*, *Ruta graveolens* e *L. sativa*, respectivamente, mas não a germinação. Eles verificaram que o OE

afetou significativamente, em todas as concentrações testadas, o alongamento de parte radicular em *L. sativa*. Os autores também testaram o  $\alpha$ -pinene e o 1.8-cineol isoladamente e não obtiveram os mesmos resultados, ressaltando que a atividade fitotóxica, provavelmente, é causada pela ação sinérgica dos compostos que compõe o OE. No experimento 2, a comparação das médias da PA foi similar ao experimento 1, contudo, para a PR os dados apresentaram menor responsividade que aos da parte aérea (Fig. 4).

Os resultados obtidos neste experimento evidenciam a presença de compostos alelopáticos no óleo de alecrim, pois segundo Rodrigues et al. (1992)[30] estes que atuam como inibidores de germinação e crescimento, interferindo na divisão celular, permeabilidade de membranas e na ativação de enzimas. Nos trabalhos realizados por Pina et al. (2009)[31] e Parvez et al. (2003) [32], a fitotoxicidade também variou conforme o órgão das plântulas analisado, sendo em alguns casos fortemente influenciada pela concentração do composto.

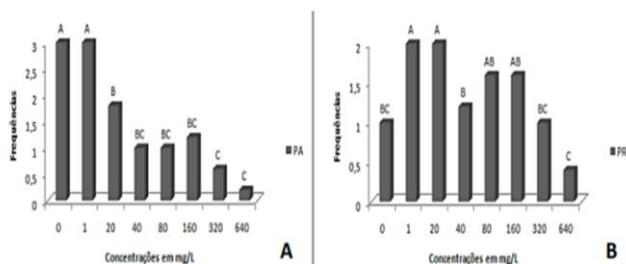


Fig. 4. Análises do crescimento da parte aérea (A) e da parte radicular de plântulas de alface (B) do experimento volatilidade do óleo essencial de alecrim (*R. officinalis* L.).

#### D. Efeito fitotóxico

O efeito citotóxico do OE de alecrim foi avaliado sobre a inibição das diferentes fases da mitose observadas em células meristemáticas da raiz de alface (Fig. 5).

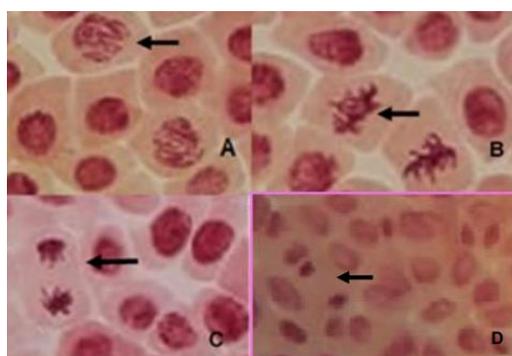


Fig. 5. Imagens referentes às fases da divisão celular mitótica em células meristemáticas de raízes de alface: prófase (A), metáfase (B), anáfase (C) e telófase (D). Fonte: acervo da autora.

No experimento 1 observamos que houve uma redução significativa da divisão celular em todas as concentrações testadas com os cálculos do IM e do lana, porém, no Imet a concentração de 20mg/L não diferiu dos controles (Fig. 6).

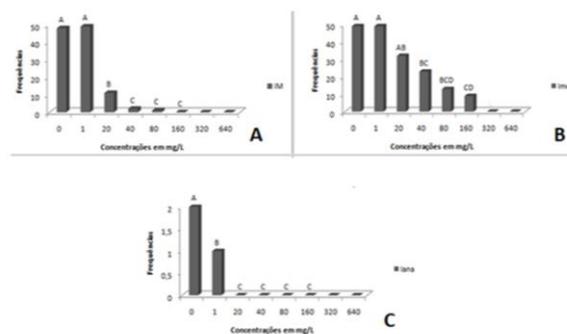


Fig. 6. Índices mitótico, metafásico e anafásico em células meristemáticas de raízes de alface do experimento do efeito de contato do óleo essencial de alecrim (*R. officinalis* L.).

Importante ressaltar que nas concentrações de 320 e 640 mg/mL não houve germinação das sementes, portanto, não ocorreu crescimento de raízes (item B).

No experimento 2, o óleo de alecrim influenciou significativamente a divisão celular das células meristemáticas analisadas a partir da concentração de 40 mg/L, indicando um efeito antiproliferativo. A redução dos IMet fica mais evidente a partir da concentração de 80mg/L, mas só houve diferença estatística nas concentrações de 160mg/L e 640 mg/L (Fig. 7B). Para o IAna, essa redução fica mais visível a partir da concentração de 20mg/L (Fig. 7C).

Em análise de OE de alecrim comercial nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1%, Hamedo e Abdelmigid (2009)[33] observaram uma redução drástica no IM na concentração mais baixa, enquanto que as demais concentrações causaram danos às células meristemáticas e não houve observação de divisão celular. De acordo com estes autores, a inibição mitótica causada por diferentes produtos químicos podem estar relacionada ao aumento do período G2 da interfase.

Resultados similares aos mostrados nos gráficos acima foram observados por Stojanović-Radić et al., (2010)[34], onde diferentes concentrações do óleo comercial de alecrim apresentaram efeito antiproliferativo por redução da mitose. Estes autores relatam que testes com bioindicador vegetal, como o *Allium* teste, não é utilizado apenas para prever citotoxicidade, mas também pode ser um preditor de atividade antitumoral e pesticida. Pressupõe-se que a citotoxicidade pode ser devido a presença dos monoterpenos oxigenados do OE que poderiam atuar como substância lipolítica típica atravessando a parede celular e a membrana do citoplasma, perturbando a estrutura de suas diferentes camadas de polissacarídeos, permeabilizando-as, e esses danos na parede celular e membrana podem levar ao vazamento de macromoléculas e lise celular [14].

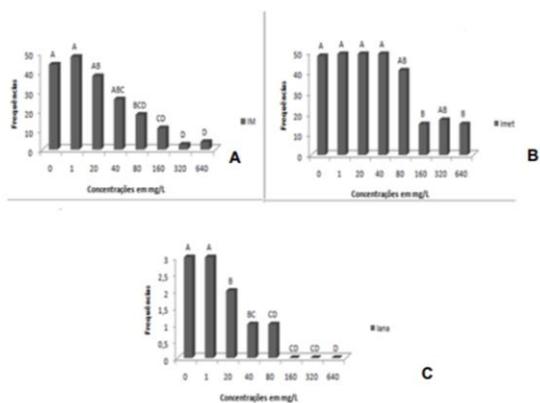


Fig. 7. Índices mitótico (A), metafásico (B) e anafásico (C) em células meristemáticas de raízes de alface do experimento do efeito de volatilidade do óleo essencial de alecrim (*R. officinalis* L.).

### E. Efeito genotóxico

A genotoxicidade foi avaliada através da análise do número de alterações dos tipos aneugênicas e clastogênicas. No experimento 1, devido a redução significativa no número de células em divisão (itens B e D), estas observações ficaram prejudicadas, pois há necessidade de divisão celular ativa para proceder de forma efetiva a análise (Fig. 8 A). No experimento 2, apesar do maior número de células em divisão ativa, esta análise também ficou prejudicada nas concentrações de 160 e 640mg/L, que diferiram estatisticamente dos controles negativos (Fig. 8B).

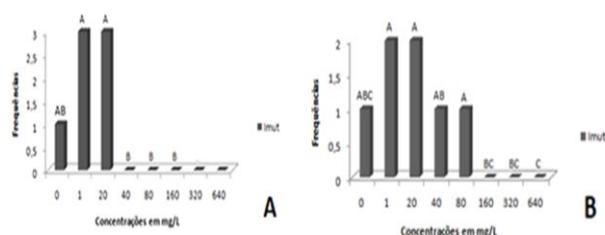


Fig. 8. Índice mutagênico em células meristemáticas de raízes de alface do experimento do efeito de contato (A) e de volatilidade (B) do óleo essencial de alecrim (*R. officinalis* L.).

A citotoxicidade e a genotoxicidade de substâncias podem ser avaliadas, respectivamente, através de alterações no processo de divisão celular sobre o organismo-teste e pela incidência de mutações cromossômicas, como quebras cromatídicas, pontes anafásicas, perda de cromossomos inteiros ou formação de micronúcleos (Fig. 9) [35].

O primeiro efeito de agentes genotóxicos é promover lesões no DNA (oxidação e dimerização de bases, adutos de DNA, entre outras) e essas lesões podem ter três destinos: reparo, alterações irreversíveis e morte celular [36], o que poderia explicar a redução de divisão celular observada nos experimentos. Alterações como quebras cromossômicas, pontes anafásicas e formação de micronúcleos foram visualizadas neste trabalho na concentração mais baixa, 20mg/L, (Fig. 9), mas não diferiram estatisticamente do controle, enquanto que nas concentrações mais altas houve morte celular.

Hamedo e Abdelmigid (2009)[33] observaram também efeitos genotóxicos na mitose representadas por algumas irregularidades cromossômicas e nucleares, contudo, corroborando os nossos dados, não foi possível analisar o efeito genotóxico nas concentrações mais altas devido à morte celular. Os autores relatam que as alterações cromossômicas formadas são semelhantes às mutações formadas por outros mutagênicos químicos. Sendo a formação de pontes anafásicas resultado de cromossomos dicêntricos e viscosidade cromossômica. Os efeitos no fuso causam anormalidades como; viscosidade, anáfase multipolar, pontes cromossômicas e distribuições desiguais de cromossomos e a formação de micronúcleos é o resultado de quebras cromossômicas e aneuploidia durante a divisão celular [33].



Fig. 9. Anomalias cromossômicas observadas em células meristemáticas radiculares de alface tratadas com o óleo essencial de alecrim, sendo (A) uma quebra na metáfase, (B) uma ponte anafásica e (C) presença de dois micronúcleos. Fonte: acervo da autora.

Segundo Cuchiara, Borges e Bobrowski (2012)[37], à medida que são elevados os níveis de concentrações de extratos de plantas que sejam ricos em substâncias tóxicas como alcalóides e taninos, a tendência é de reduzir o número de células em divisão, aumentando as chances de morte celular. De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho para os efeitos do óleo essencial de alecrim, pôde-se perceber que as concentrações mais altas acabaram por reduzir e/ou inibir por completo a germinação e os demais índices, podendo estas, serem utilizadas para um efeito antimitótico ou antiproliferativo. Concentrações abaixo de 20mg/L, apresentaram efeitos similares ao da água nas condições desse experimento. Porém, devemos lembrar que as proporções dos principais constituintes do óleo essencial de alecrim variam de acordo com o estágio vegetativo e as condições bioclimáticas de produção.

### IV. CONCLUSÕES

O óleo essencial de alecrim evidencia atividade alelopática, fitotóxica e citotóxica nas maiores concentrações testadas. No experimento de contato das sementes de alface com o OE os efeitos sobre a germinação, o crescimento e a divisão celular mitótica foram mais severos do que quando a exposição foi apenas aos compostos voláteis. Quanto a genotoxicidade sugere-se continuidade na pesquisa para obtenção de respostas conclusivas.

## REFERENCES

- [1] J.M. Andrade, C. Faustino, C. Garcia, D. Ladeiras and P.R. Catarina, "*Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity". Future Sci. OA, vol.4, n.4, pp. 1-18, 2018.
- [2] A.S. B. Lima, I. O Leite, L. R. de A Silva, P. W. Dias, T.A. Souza, E. A. dos Santos and M.C. Diniz, "Utilização de *Uncaria tomentosa* (unha de gato) como fitoterápico". Revista Ingi, vol. 3, n. 1, pp. 279-289, 2019.
- [3] H. Lorenzi, H. and F.J.A. Matos, "Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas". 1st ed., Instituto Plantarum, Nova Odessa, 511 pp. 2002.
- [4] F. Fratini, S. Casella, M. Leonardi, F. Pisseri, V.V. Ebiani, L. Pistelli and L. Pistelli "Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of the irmain constituents against some strains supporting lives tock mastites". Fitoterapia, vol. 96, pp. 1-7, 2014.
- [5] L.M. Gauch, F. Silveira-Gomes, R.A. Esteves, S.S. Pedrosa, E.S. G., A.C. Arruda and S.H. Marques-da-Silva, "Effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil on germ tube formation by *Candida albicans* isolated from denture wearers". Rev. Soc Bras Med Trop., vol. 47, n.3, pp.389-91, 2014.
- [6] H.B. Shin, M.S. Choi, B. Ryu, N.R. Lee, H.I. Kim and H.E. Choi, "Antiviral activity of carnosic acid against respiratory syncytial virus". Virol J., vol.10, p. 1-11, 2013.
- [7] J. Smullen, M. Finney, D.M. Storey and H.A. Foster, "Artificial dental plaque formation in vitro by plant extracts". J Appl Microbiol., vol. 113, n. 4, pp. 964-73, 2012.
- [8] M. González-Vallinas, S. Molina, G. Vicente, V. Zarza, R. Martín-Hernández, M.R. García-Risco, T. Fornari, G. Reglero and A. Ramírez de Molina, "Expression of microRNA-15b and the glycosyl transferase GCNT3 correlates with antitumor efficacy of Rosemary diterpenes in colon and pancreatic cancer". PLoSOne, vol. 9, n. 6, 2014; e98556.
- [9], M.H. Yu, J.H. Choi, I.G. Chae, H.G. Im, S.A. Yang, K. More and J. Lee "Suppression of LPS induced inflammatory activities by *Rosmarinus officinalis* L." FoodChem., vol.136, n. 2, pp. 1047-54, 2013.
- [10] S.B. Ahmed, R.M. Sghaier, F. Guesmi, B. Kaabi, M. Mejri, H. Attia, D. Laouini and I. Smaali, "Evaluation of antileishmania, cytotoxic and antioxidant activities of essential oils extracted from plants issued from the leishmaniasis-endemic region of Sned (Tunisia)". Nat Prod Res., vol.25, n.12, pp.1195-201, 2011.
- [11] A. Rašković, I. Milanović, N. Pavlović, T. Čebović, S. Vukmirović and M. Mikov "Antioxidant activity of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepato protective potential". BMC Complementary and Alternative Medicine, vol. 14, pp. 225, 2014.
- [12] R. S. Borges, B.L.S. Ortiz, A.C.M. Pereira, H. Keita and J.C.T. Carvalho, "*Rosmarinus officinalis* Essential oil: A review of its phytochemistry, antiinflammatory activity, and mechanisms of action involved", Journal of Ethnopharmacology, vol. 229, pp. 29-45, 2019.
- [13] L. de M.S. Zago, "Vinte e dois anos de pesquisa sobre plantas medicinais: uma análise cienciométrica", Tecnia, vol.3, n.1, 2018.
- [14] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck and M. Idaomar, "Biological effects of essential oils– A review". Food and Chemical Toxicology, vol. 46, n.2, pp. 446– 475, 2008.
- [15] P.M. Dey and J.B. Harbone, Plant biochemistry. London: Academic Press, 1997.529p.
- [16] A.P. Peron, J.Felipes, G.I. Mattge, I.B. Cantagalli, R.G. Mariucci, and V.E.P. Vicentini, "Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* Less. e *Solanum melongena* L. em células de medula óssea de ratos Wistar". Rev. Bras. Biocien., vol.6, pp. 127-130, 2008.
- [17] M.G. Dias, T.S. Canto-Dorow, A.P.D. Coelho and S.B. Tedesco, "Efeito genotóxico e antiproliferativo de *Mikania cordifolia* (L. F.) Willd. (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L.", Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, vol.16, n.2, pp.202-208, 2014.
- [18] G. Lubini, J.M. Fachineto, H.D. Laughinghouse, J.T. Paranhos, A.C.F. Silva and S.B. Tedesco, "Extracts affecting mitotic division in root-tip meristematic cells". Biologia, vol. 63, pp. 647-651, 2008.
- [19] S.M. Sousa, P.S. Silva, J.M.S. Campos and L.F. Viccini, "Cytotoxic and genotoxic effects of two medicinal species of Verbenaceae", Caryologia, vol. 62, n. 4, pp. 326-333, 2009.
- [20] A.C. Luz, I.R. Pretti, J.C.V. Dutra and M.C.P. Batitucci, "Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de *Plantago major* L. em sistemas teste in vivo". Rev. Bras. Plantas Med. [online], vol.14, n.4, 2012.
- [21] A.G. Ferreira and M.E.A. Áquila, "Alelopatia: uma área emergente da Ecofisiologia". Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, vol.12, pp.175-204, 2000.
- [22] C.R Silva, M.R Monteiro, A. Caldeira-de-Araújo and R.J.A.C. Bezerra, "Absence of mutagenic and cytotoxic potentiality of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) evaluated by microbiological tests". Rev. Bras. Farmacogn, v. 14 (Supl. 1), pp.1-3. 2004.
- [23] BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399p.

[24] M. Guerra and M.J. Souza, "Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana". São Paulo, Funpec, 2002. 131 p.

[25] G. Nieto, G. Ros and J. Castillo, "Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): A Review", *Medicines* [online], vol. 5, 13p. 2018.

[26] W. Wang, N. Li, M. Luo, Y. Zu and T. Efferth, "Antibacterial activity and anticancer activity of *L. essential oil* compared to that of its main componentes". *Molecules*, vol. 3, pp. 2704–2713, 2012.

[27] T.L. Weir, S.W. Park and J.M. Vivanco, "Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelo Chemicals". *Current Opinion in Plant Biology*, Saint Louis, vol. 7, n. 4, pp. 472-479, 2004.

[28] E.E. Podesta and W.C. Plaxton, "Regulation of cytosolic carbon metabolismo in germinating *Ricinus communis* cotyledons". *Planta*, vol. 194, n. 3, pp. 374-380, 1994.

[29] L. Caputo, M. Trotta, A. Romaniello and V. Feo, "Chemical composition and phytotoxic activity of *Rosmarinus officinalis* essential oil". *Natural Product Communications*, vol. 13, n. 10, pp. 1367 – 1370, 2018.

[30] L.R.A. Rodrigues, T.J.D. Rodrigues and R.A. Reis, "Alelopatia em plantas forrageiras". Jaboticabal: FUNEP, 68p. 1992.

[31] G. O. Pina, F. Borghetti, C.E.S. Silveira and L.A. Pereira, "Effects of *Eugenia dysenterica* leaf extracts on the growth of sesame and radish".

*Allelopathy Journal*, vol. 23, n. 2, n. 2, pp. 313-322, 2009.

[32] S.S. Parvez, M.M. Parvez, E. Nishihara, H. Gemma and H. Fujii, "*Tamarindus indica* L. leaf is a source of allelopathic substance". *Plant Growth Regulation*, vol. 40, n. 2, pp. 107-115, 2003.

[33] H.A. Hamedo and H.M. Abdelmigid, "Use of antimicrobial and genotoxicity potentiality". *The Open Biotechnology Journal*, vol. 3, pp. 50-56, 2009.

[34] Z. Stojanović-Radić, Z., M. Nešić, L. Čomić, and N. Radulović, "Antimicrobial activity and cytotoxicity of commercial Rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.)" *Biologica Nyssana*, vol.1, n.1-2, pp. 83-88, 2010.

[35] P.R. Peres, A.A. Munhos, L.R. Ugoski, R.A. Freitag and V.L. Bobrowski, "O uso de compostos antioxidantes naturais e seu efeito genotóxico/citotóxico". In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTIFICA DA UFPEL, Pelotas, 2014, Anais... Pelotas: Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 2014. On line Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/cic/anais/anais2014/>

[36] B.J. Majer, T. Grummt, M. Uhl and S. Knasmüller, "Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in the aquatic environment". *Acta Hydrochimica Hydrobiologica*, vol. 33, n. 1, pp. 45-55, 2005.

[37] C.C. Cuchiara, C.S. Borges and V.L. Bobrowski, "Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água". *Tecnologia Ciência Agropecuária*, vol.6, n.1, pp.33-38, 2012. M. Young, *The Technical Writer's Handbook*. Mill Valley, CA: University Science, 1989.