

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico - CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Análise dos efeitos fisiológico e citotóxico de extrato etanólico de
Origanum vulgare L. utilizando *Lactuca sativa* L. como bioindicador**

Luísa Reinhardt Ugoski

Pelotas, 2015

Luísa Reinhardt Ugoski

Análise dos efeitos fisiológico e citotóxico de extrato etanólico de *Origanum vulgare* L. utilizando *Lactuca sativa* L. como bioindicador

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Vera Lucia Bobrowski

Pelotas, 2015

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

U27a Ugoski, Luísa Reinhardt
Análise dos efeitos fisiológico e citotóxico de extrato etanólico de *Origanum vulgare* L. utilizando *Lactuca sativa* L. como bioindicador / Luísa Reinhardt Ugoski. – 43f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2015. – Orientador Vera Lucia Bobrowski.

1.Biotecnologia. 2.*Origanum vulgare* L. 3.*Lactuca sativa* L. 4.Efeitos fisiológicos. 5.Efeitos citotóxicos. 6.Extrato.
I.Bobrowski, Vera Lucia.. II.Título.

Luísa Reinhardt Ugoski

Análise dos efeitos fisiológico e citotóxico de extrato etanólico de *Origanum vulgare* L. utilizando *Lactuca sativa* L. como bioindicador

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 04 de Dezembro de 2015.

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Vera Lucia Bobrowski (Orientadora)
Doutora em Genética e Biologia Molecular
pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.^a Dr.^a Luciana Bicca Dode
Doutora em Biotecnologia Agrícola
pela Universidade Federal de Pelotas

Prof.^a Dr.^a Beatriz Helena Gomes Rocha
Doutora em Ciência e Tecnologia de
Sementes pela Universidade Federal de Pelotas.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar até a escolha que fiz, pela força e perseverança que me acompanharam durante toda a minha graduação, pelas preces atendidas, por me levantar quando precisei.

Agradeço aos meus pais Paulo e Mari, pelo amor e carinho, pelas palavras dirigidas nos momentos que precisei, pelas caronas quando me atrasei, pelo apoio financeiro durante toda a minha formação. Por todo esforço que vocês vem desempenhando na construção de uma base para que eu comece a minha vida “fora do ninho”. Amo vocês.

Agradeço a Deus por ter me dado um irmão (Guilherme), que por mais que tivéssemos nossas diferenças de idade, foi meu companheiro de infância, muito inventei brincadeiras só para vê-lo sorrir. Quando pequenos, lembro de muitos desentendimentos, coisas de irmão, mas me recordo de muitas risadas e momentos bons. Hoje já crescidos, agradeço pelas nossas conversas e conselhos que de vez em quando trocamos, te amo mano.

Agradeço aos meus avós paternos Paulo e Ivone pelo carinho, por todas vezes que fizeram orações pedindo a Deus que me abençoasse, pelo preocupação ao perguntar sobre como estavam as aulas e a faculdade. Agradeço ao meu avô Nelson pelo carinho dedicado a mim e pelas palavras de apoio. Ainda, já tendo partido da vida terrena, agradeço a Deus os momentos que tive oportunidade de viver com minha avó Ceni, que com certeza estaria, e sei que está muito feliz ao me ver completando essa etapa de minha vida.

Agradeço a minha dinda Mery pelo carinho e atenção, pelas conversas sobre a nossa graduação, por ter acompanhado os editais de chamada oral do meu Curso, e por ter me alertado sobre isso. Agradeço de uma forma geral todos meus familiares, por sempre terem me acolhido, e me amado. Pois, família é tudo, é o que me faz ser o que hoje sou.

Agradeço ao meu noivo Carlos Alberto Conceição por estar sempre ao meu lado, por me amar e me cuidar. Como já faz parte da minha vida a cinco anos, participou de toda a minha trajetória na graduação, vivenciou todos meus

momentos de preocupação e de vitórias. Te agradeço pela paciência, por ter me apoiado todas as vezes que precisei. Te amo muito meu amor.

Agradeço a Deus por ter me dado a alegria de ter dois anjinhos de quatro patas na minha vida, Mayla e Mel, em especial a pequenina que adotei, que é então considerada como filha. Ela tem o poder incrível de me fazer feliz, como eu amo essa minha filhotinha.

Agradeço a família do meu noivo, Vanderlea, Vanira, Valéria e família, por todo carinho que dedicam a mim, por todos momentos que viemos passando juntos, que Deus esteja sempre abençoando a união de nossas famílias.

Agradeço a todas mulheres da minha vida, Jéssica Dolinski, Maureen Moita, Jéssica Camacho, Alana Schmegel, Edna Berny, Helena Machado, Clarissa Bastos, Flúvia Bastos, Paola Amaral, Parla Macedo e Bárbara Zambrano pela amizade linda que temos, por tudo o que vivemos e ainda iremos viver. Amo vocês.

Agradeço a todos meus colegas de aula, em especial, as amigas, Fernanda Kegles, Jéssica Waldman e Nathalia Stark por tudo o que compartilhamos juntas. As que interromperam a caminhada e seguiram outros caminhos, Catrine Mortola, Marina Dias da Costa, Jéssica Moreira, meu muito obrigada pelos momentos maravilhosos que tivemos oportunidade de viver. A faculdade sem cada uma de vocês, jamais teria sido a mesma.

Agradeço a todos os professores da minha graduação, em especial, a minha orientadora Vera Bobrowski, orientadora acadêmica Luciana Dode e a professora Beatriz Rocha, pelos ensinamentos, pela dedicação, paciência, e por terem contribuído na construção do meu conhecimento.

Agradeço por fim, aos órgãos nacionais de pesquisa que me proporcionaram bolsa durante a minha graduação, da qual, os conhecimentos adquiridos levarei na minha bagagem.

***“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.”***

Charles Chaplin

Resumo

UGOSKI, Luísa Reinhardt. **Análise dos efeitos fisiológico e citotóxico de extrato etanólico de *Origanum vulgare* L. utilizando *Lactuca sativa* L. como bioindicador.** 2015. 44f. Trabalho de conclusão de curso – Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2015.

A busca por alimentos de alta qualidade, livres de conservantes sintéticos e com maior vida de prateleira vem crescendo muito nos últimos anos. Com isso, estudos vêm sendo realizados a fim de encontrar potenciais vegetais que possam ser utilizados como conservantes naturais. O *Origanum vulgare* L. (orégano) é muito conhecido por suas propriedades antimicrobiana e antioxidante, porém, pouco se sabe quanto a sua inocuidade. Sendo assim, com esse trabalho objetivou-se analisar os efeitos fisiológico e citotóxico do extrato etanólico de *Origanum vulgare* L. sobre sementes de *Lactuca sativa* L. (alface). A análise do efeito fisiológico se deu através da observação da germinação, crescimento de parte aérea e radicular das plântulas de alface, já o efeito citotóxico foi avaliado através da análise das fases de divisão celular, utilizando células meristemáticas da raiz de alface. O extrato etanólico de orégano demonstrou uma redução significativa na germinação das plântulas de alface de acordo com o aumento da concentração do extrato. Em relação ao crescimento de parte aérea e radicular, as concentrações a partir de 50% afetaram negativamente o desenvolvimento, já nas concentrações de 12,5% e 25% estimularam o crescimento dessas variáveis. Sobre o efeito citotóxico, não houve variação significativa quanto ao índice interfásico nem em relação à análise do índice mitótico. Quando analisado os índices de divisão por fases encontrou-se diferença estatisticamente significativa apenas para o índice metafásico, pois na concentração 12,5% do extrato, observou-se um aumento de células nesta fase com relação às demais concentrações e ao controle. Assim como, houve uma relevante redução neste índice na concentração 100% do extrato. Além disso, identificou-se aberrações cromossômicas quando utilizado o extrato nas concentrações 12,5%, 25% e 50%. Sendo assim, conclui-se que o extrato etanólico de orégano apresentou efeito fisiológico e citotóxico sobre a planta bioindicadora.

Palavras-chave: *Origanum vulgare* L.; *Lactuca sativa* L.; fisiológico; citotóxico; extrato.

Abstract

UGOSKI, Luísa Reinhardt. **Análise dos efeitos fisiológico e citotóxico de extrato etanólico de *Origanum vulgare* L. utilizando *Lactuca sativa* L. como bioindicador.** 2015. 44f. Trabalho de conclusão de curso – Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2015.

The search for high quality food, free of synthetic preservatives and greater shelf life has increased greatly in recent years. Thus, studies have been conducted in order to find potential plant that can be used as natural preservatives. The *origanum vulgare* L. (oregano) is well known for its antimicrobial and antioxidant properties, however, little is known about their safety. Therefore, with this study aimed to analyze the physiological and cytotoxic effects of ethanol extract of *origanum vulgare* L. on seed *lactuca sativa* L. (lettuce). The analysis of the physiological effect was given by observing the germination, growth of shoots and roots of lettuce seedlings, since the cytotoxic effect was assessed by analyzing the phases of cell division using meristematic cells lettuce root. The ethanolic extract of oregano demonstrated a significant reduction in germination of lettuce seedlings in accordance with increasing extract concentration. Compared with the growth of shoots and roots, concentrations from 50% negatively affected the development, since in 12.5% and 25% concentrations stimulated the growth of these variables. About cytotoxic effect, there was no significant variation in the interphase index or in relation to the analysis of mitotic index. When analyzed the phases division rates there was a statistically significant difference only for the metaphase index, because the concentration of the extract 12.5%, there was an increase of cells at this stage in relation to other concentration and control. Just as there was a significant reduction in this index at 100% concentration of the extract. In addition, it was identified chromosomal aberrations when using the concentrations 12.5%, 25% and 50%. Therefore, it is concluded that the ethanol extract of oregano showed physiological and cytotoxic effect on bioindicator.

Keywords: *Origanum vulgare*; *Lactuca sativa*; physiological; cytotoxic; extract

Lista de Figuras

- Figura 1 - Planta de orégano (*Origanum vulgare* L.) em floração. Adaptada de: <https://vsetyt.wordpress.com>.....17
- Figura 2 – Equipamento rotaevaporador. Pelotas, 2015
.....27
- Figura 3 - Montagem dos bioensaios em caixas gerbox sobre papel germitest (A) e manutenção em câmara de crescimento a 25°C (B). Pelotas, 2015
.....29
- Figura 4 - Efeito fisiológico do extrato etanólico de orégano de diferentes concentrações sobre a germinação das sementes de alface. (A) Controle; (B) 12,5%; (C) 25%; (D) 50% e (E) 100%. Pelotas, 2015
.....32
- Figura 5 - Efeito citotóxico das concentrações 12,5%, 25%, 50% e 100% do extrato etanólico de orégano em comparação ao controle analisado através do índice interfásico e do índice mitótico. Pelotas, 2015
.....33
- Figura 6 - Fases da mitose observadas em células meristemáticas radiculares de alface em aumento de 400X, submetidas a diferentes concentrações do extrato etanólico de orégano: (A) 12,5%; (B) 25%; (C) 50%; (D) 100%. As setas indicam a presença de pontes anafásicas nas concentrações 12,5%, 25% e 50%
.....35

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Análise do efeito fisiológico de diferentes concentrações do extrato etanólico de orégano sobre a germinação inicial (GI), germinação final (G) e sobre o crescimento da parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CPR). Pelotas, 2015.....	31
Tabela 2 - Análise do efeito citotóxico nas fases da mitose em análise pela técnica de varredura no microscópio óptico comparadas pelo teste de Tuckey a 1%. Pelotas, 2015.....	34

Lista de Abreviaturas e Siglas

DTAs – doenças transmitidas por alimentos

cm – centímetro

g – grama

UV - ultravioleta

BHA - butil-hidroxianisol

BHT – butil-hidroxitolueno

GP- galato de propila

THBQ - terc-butilhidroquinona

ERO - espécies reativas do oxigênio

EO – estresse oxidativo

pH – potencial Hidrogeniônico

ml – mililitro

°C – grau Celsius

% - porcentagem

GI – germinação inicial

G - germinação final

RAS – regras para análise de sementes

CPA – comprimento de parte aérea

CPR – comprimento de parte radicular

HCl 5N – ácido clorídrico 5 normal

Sumário

Resumo.....	7
Abstract.....	8
Lista de Figuras.....	9
Lista de Tabelas.....	10
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	11
1. Introdução.....	13
2. Objetivos.....	15
2.1. Objetivo Geral.....	15
2.2. Objetivo Específico.....	15
3. Revisão Bibliográfica.....	16
3.1. <i>Origanum vulgare</i> L. (Lamiaceae).....	16
3.2. Metabólitos Secundários.....	17
3.3. Propriedades Antimicrobianas das Plantas.....	20
3.4. Propriedades Antioxidantes das Plantas.....	23
3.5. Bioindicadores.....	25
4. Materiais e Métodos.....	27
4.1. Obtenção do Extrato Etanólico de <i>Origanum vulgare</i> L.....	27
4.2. Metodologia.....	28
4.3. Análise Estatística.....	30
5. Resultados e Discussão.....	30
6. Conclusões.....	36
7. Referências Bibliográficas.....	37

1. Introdução

A contaminação de alimentos por patógenos é um problema de saúde pública que pode promover o desenvolvimento de doenças transmitidas por alimentos (DTAs). A incidência das DTAs parece estar relacionada a inúmeros fatores, como: condições inadequadas de saneamento básico, exposição a alimentos inseguros e ausência de boas práticas na produção e manipulação desses.

As DTAs podem ser causadas por diversos agentes etiológicos, principalmente microrganismos, os quais penetram no organismo humano através da ingestão de água e alimentos contaminados. Estes agentes podem ser químicos, como pesticidas e metais tóxicos ou biológicos, como microrganismos patogênicos. Doenças causadas pela ingestão de plantas tóxicas e micotoxinas são também consideradas DTAs (AMSON et al., 2006). Segundo Afonso (2008), dentre os fatores que contribuem para os riscos alimentares estão, o não cumprimento das boas práticas, armazenagem inadequada, contaminação cruzada entre alimentos crus e cozidos, entre outros.

Sendo assim, o uso de conservantes sintéticos tem buscado inibir ou retardar o processo de oxidação e decomposição dos alimentos. Entretanto, o emprego dos conservantes sintéticos tem sido alvo de questionamentos quanto à inocuidade (NOBUYOKI et al., 2003; PITARO et al., 2012).

Tais substâncias mesmo abaixo das doses diárias permitidas, podem causar efeitos negativos à saúde, tais como: ação tóxica sobre o fígado, reações alérgicas, descalcificação, redução da absorção do ferro, aumento de cálculos renais, entre outros.

A fim de reduzir o uso de conservantes sintéticos, cresce a busca por conservantes naturais. Pois, segundo Pereira et al. (2006), além dos benefícios proporcionados à saúde, diversos estudos têm demonstrado o efeito inibidor de condimentos no desenvolvimento de microrganismos deterioradores e patogênicos veiculados por alimentos. Da mesma forma, tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, pesquisas têm sido dirigidas no sentido de encontrar

produtos naturais com atividade antioxidante os quais permitirão substituir os sintéticos (RAMALHO et al., 2006).

O *Origanum vulgare* L. (orégano), muito utilizado como condimento, é rico em compostos fenólicos, além disso, possui propriedades antimicrobianas e antioxidantes.

A grande maioria das plantas e seus compostos metabólitos não foram devidamente estudados quanto a seus potenciais, assim o uso de sistemas testes vegetais como o de *Allium cepa* e *Lactuca sativa* têm auxiliado no estudo dos efeitos de extratos vegetais visando a detecção de suas propriedades.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos fisiológico e citotóxico de extrato etanólico de *Origanum vulgare* L. utilizando *Lactuca sativa* L. como bioindicador.

2.2. Objetivo Específico

Analisar o efeito fisiológico de extrato etanólico de *Origanum vulgare* L. sobre a germinação inicial e geminação final de plântulas de alface.

Avaliar o efeito fisiológico de extrato etanólico de *Origanum vulgare* L. sobre o crescimento da parte aérea e parte radicular de plântulas de alface.

Observar o efeito citotóxico de extrato etanólico de *Origanum vulgare* L. em células meristemáticas de raiz de plântulas de alface.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae)

O orégano (*Origanum vulgare* L.) é uma erva nativa da Europa, África e sudoeste da Ásia (BORGES et al., 2012). Caracteriza-se por ser uma planta vivaz, aromática, com numerosos caules eretos quadrangulares pilosos, além de folhas ovaladas opostas e minúsculas flores terminais com coloração roxa ou cor-de-rosa dispostas em pequenos ramos compactos, como pode ser observado na figura 1.

O orégano é muito confundido com *Origanum majorana* L. (manjerona), mas possui aroma e sabor característico mais acentuado. É uma planta que tem entre 25 a 40 cm de altura, com um pouco mais de 35mm, ou seja, maior do que a da manjerona, e com as pontas (extremidades) levemente mais pontiagudas (RODRIGUES et al., 2005)

É uma espécie de clima temperado e prefere locais isolados. Suas sementes são minúsculas (1g contém 12.000 sementes) e, portanto devem ser semeadas com cuidado (CASTRO; CHEMALE, 1995 apud SANTOS, 2008). A semeadura pode ser feita o ano todo, seu ciclo é de 80 dias no verão e 100 dias no inverno, também pode ser perene (ISLA, 2006 apud SANTOS, 2008). O ponto de colheita se dá quando as folhas atingem o tamanho máximo, porém antes que se tornem pontiagudas, enegrecidas e que os caules endureçam (SANTOS, 2008).

O orégano é um dos condimentos mais utilizados na culinária brasileira no preparo de carnes, ovos, peixes, panificação e frutos do mar (CORRÊA et al., 2010). Além disso, é considerado um dos mais antigos conservantes alimentares que se tem notícia. Era utilizado para evitar que houvesse a deterioração precoce do alimento, assim como a formação de bolores (CARREIRO et al, 2009 apud PANIZZA et al, [200-]).

É muito conhecido por suas propriedades terapêuticas, sobretudo por seu potencial antimicrobiano, antifúngico e antioxidante, no entanto, pouco se sabe sobre a toxicologia desta planta (SCHUCH, 2010).



Figura 1. Planta de orégano (*Origanum vulgare* L.) em floração. Fonte: <https://vsetyt.wordpress.com>

3.2. Metabólitos Secundários

Segundo Von Poser e Mentz (2007 apud SANTOS et al., 2008), todas as espécies vegetais através do processo da fotossíntese produzem substâncias, como carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, estas substâncias são resultantes do metabolismo primário e são necessárias à sobrevivência do vegetal. Além destas macromoléculas sintetizadas pelos vegetais, há também uma gama de substâncias as quais não estão diretamente ligadas à sobrevivência destes, mas são de extrema importância na interação ecológica do vegetal com outros organismos, essas substâncias são resultantes do metabolismo secundário e desempenham diferentes funções.

A família botânica Lamiaceae, com distribuição cosmopolita, inclui cerca de 300 gêneros e 7500 espécies (FURLAN, 2014). A maioria das espécies é conhecida pelo seu uso condimentar, e muitas delas possuem atividade biológica já relatada na literatura, por diversos autores (LORENZI; MATOS, 2002 apud LIMA et al., 2007).

Várias espécies do gênero *Origanum* (Lamiaceae) por exemplo, têm entre seus principais constituintes derivados do metabolismo secundário: carvacrol e timol que são acompanhados por outras substâncias como limoneno, β -cariofileno, canfeno, linalol, α - pineno, que são encontrados em menor concentração (NUNES, 2010).

Dentre os constituintes químicos do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), Lamiaceae, sobressaem-se os flavonóides e ácidos fenólicos (CUNHA, 2012 apud FRESCURA et al., 2013), os quais são dois grandes grupos de compostos fenólicos. Estas substâncias destacam-se por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatória e antitumoral (BARBERÁN et al., 2001).

Em estudo realizado com *Mentha arvensis* L (Lamiaceae) foram identificados além do neo-isomentol, outros monoterpenos como: limoneno, linalol, p-ment- 3-enol, mentona, isomentona, neo-mentol, piperitona e dois sesquiterpenos: cariofileno e germacreno-D (GERSHENZON et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2012 apud ALVES, 2012).

Segundo Evangelista (2012) estudos realizados com os extratos aquoso e hexânico da espécie de *Lavandula officinalis* indicaram a presença de algumas substâncias diferentes conforme o modo de extração. As classes de taninos; flavonóides; saponinas e carboidratos totais apresentaram resultados positivo no extrato aquoso, porém, não foram identificados quinonas; resina; aminoácidos e alcalóides. Já no extrato hexânico, as classes de taninos; resina e aminoácidos apresentaram resultados positivo, entretanto, não foram identificadas as classes de flavonóides; quinonas; saponinas; carboidratos totais e alcalóides.

A *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) apresenta altos níveis de compostos fenólicos, como flavonóides e ácido rosmarínico (MÜZELL, 2006). Além disso, contém cerca de 0,5% de compostos fenólicos em folhas, como glicosídios de luteolina, quercetina, ácido caféico e ácido rosmarínico (BARNES et al., 2005 apud MÜZELL, 2006).

Os metabólitos secundários são encontrados geralmente em pequenas concentrações no vegetal, sendo produzidos em determinados estágios de desenvolvimento e são característicos de cada espécie vegetal. Normalmente

são sintetizados em uma determinada parte da planta e armazenados em outra (SANTOS, 2008).

De uma forma geral, o metabolismo secundário vegetal pode sintetizar substâncias pertencentes à diferentes classes químicas dentre as quais cita-se: flavonóides, alcalóides, taninos, cumarinas, terpenos, quinonas, dentre outras (SANTOS, 2007 apud SANTOS, 2008). As três principais classes de compostos secundários são: os alcalóides, terpenóides e os compostos fenólicos (DELBONE, 2010). Peres (2004) afirma que estes grupos de compostos costumam proteger as plantas contra raios UV, insetos, fungos, vírus e bactérias.

Os alcalóides, em geral, são tóxicos e apresentam gosto amargo, por isso, plantas que possuem este composto são evitadas por animais e insetos em sua dieta (HARBORNE; WILLIAMS, 2000 apud FORMAGIO et al, 2010), são efetivos em seu papel medicinal e também exercem importante papel como substâncias de defesa contra insetos herbívoros (GUERRA; NODARI, 2001 apud SOUZA FILHO et al, 2011) Segundo Peron et al (2014), os alcalóides podem atuar como reguladores de crescimento, muito provavelmente inibidores de germinação, devido ao seu poder quelante e/ou citotóxico.

De acordo com Heldt (2005 apud DELBONE, 2010), alguns terpenóides atuam como antibióticos, protegendo as plantas de microrganismos patogênicos e outros são formados somente em resposta a infecção. O autor ainda ressalta que algumas plantas sintetizam esse composto com intuito de inibir a germinação e desenvolvimento de plantas competidoras. A atividade antimicrobiana dos terpenos pode estar ligada às propriedades lipofílicas destes compostos e suas interações com as bicamadas fosfolipídicas das bactérias (DORMAN, 2000).

Os fenólicos e derivados correspondem à classe de metabólitos secundários, que compreendem desde fenóis simples até taninos de estrutura complexa (RICE, 1984 apud MAZZAFERA, 2003). Balasundram et al. (2006) cita que um dos principais efeitos dos compostos fenólicos tem sido atribuído à ação antioxidante em alimentos. E segundo Rice (1984 apud ALMEIDA, 2006) são considerados potentes inibidores da germinação de sementes, crescimento da parte aérea e alongamento das raízes.

Salvo em raros casos de alergia, pouca relevância toxicológica é dada ao consumo de flavonoides (compostos fenólicos), porém estes polifenólicos em doses altas e em uso prolongado ocasionaram toxicidade significativa em mamíferos (RIBEIRO et al., 2006).

A síntese desses metabólitos secundários é dependente do tipo de interação ou informação a transmitir, muitos desses são sintetizados desde os primeiros estágios de crescimento (defesa constitutiva), como no caso de interações planta-planta de uma mesma espécie, ou ao contrário, estes podem ser sintetizados por estímulos externos, como a presença de herbívoros, que se traduzem em um “alarme metabólico” que disparam suas rotas biossintéticas (defesa induzida) (TALLAMY; RAUPP, 1991 apud OLIVEIRA, 2009).

De acordo com Neto e Lopes (2007), existem fatores ambientais que interferem na produção de metabólitos secundários, tais como: sazonalidade, altitude, radiação ultravioleta, ritmo circadiano, disponibilidade hídrica, índice pluviométrico, disponibilidade de nutrientes no solo, poluição atmosférica, estímulos mecânicos e ataques por patógeno.

Segundo Oliveira et al. (2012), o uso apropriado dos compostos majoritários traz muitos benefícios, porém, seus efeitos necessitam de maiores investigações.

3.3. Propriedades Antimicrobianas das Plantas

De acordo com Souza et al. (2003 apud CORDEIRO, 2013), os compostos de natureza vegetal, em especial as especiarias e seus produtos derivados (óleos essenciais e extratos), apresentam um potencial relevante como agentes de inibição do crescimento de microrganismos, mostrando que elementos que se apresentavam apenas como vetores de aromas e gostos característicos, atualmente apresentam uma nova perspectiva de utilização.

Entre as muitas especiarias utilizadas primeiramente para flavorizar os alimentos, e que ao mesmo tempo tem reconhecido potencial como antimicrobianos incluem-se: alho, cebola, noz-moscada, *curry*, mostarda,

pimenta-preta, tomilho, orégano, sálvia, alecrim, menta, pimenta jamaicana, anis, manjeriço, páprica, açafão, cássia, aipo, endro, gengibre, coentro, manjerona, cravo, canela e cominho (SAGDIÇ et al., 2003 apud SANTOS, 2006).

As espécies do gênero *Origanum* apresentam atividade contra bactérias Gram (-) como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae* e as Gram (+) como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus subtilis*. Também apresentam capacidade antifúngica contra *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus Niger*, *Geotrichum* e *Rhodotorula* (ARCILA-LOZANO et al., 2004).

De acordo com Fukayama et al. (2005), dentre as alternativas de aditivos fitogênicos, o extrato de orégano se destaca, visto que entre os metabólitos secundários, possui dois dos principais fenóis com propriedades antimicrobianas, o carvacrol e o timol, que agem sobre a membrana celular bacteriana. São capazes de dissolverem-se na membrana microbiana, penetrando na célula. Assim, podem alterar os mecanismos essenciais para o metabolismo microbiano, causando a morte das bactérias (GANDRA et al., 2013).

Devido a evolução das civilizações, surgiu a necessidade de estocar e conservar os alimentos. E a conservação desses é uma grande preocupação, pois desde o momento em que são colhidos, durante o processamento, estocagem até o consumo, os alimentos estão sujeitos a diversos tipos de deteriorações, causadas principalmente por microrganismos, enzimas e reações com o oxigênio do ar (FONSECA, 2010).

Isso ocorre, pois os alimentos são substâncias compostas por proteínas, carboidratos e lipídios, ou seja, todos possíveis substratos nutritivos para um ou mais tipos de microrganismos, além de apresentarem microelementos, como as vitaminas e minerais, que funcionam muitas vezes como fatores de crescimento. Assim, os microrganismos agem utilizando este arsenal de constituintes para a manutenção de suas funções metabólicas, desenvolvimento e reprodução. (FRANCO; LANDGRAF, 1996 apud SOUZA, 2006).

A contaminação dos alimentos pode ser de natureza biológica, química ou física. As ocorrências envolvendo bactérias e seus produtos tóxicos, vírus, fungos e parasitas são as mais comuns, sendo que algumas levam até a letalidade (SOUZA, 2012).

Riedel (2005 apud OLIVEIRA, 2010) comenta que uma relevante consequência da presença de microrganismos em alimentos, consiste na probabilidade da ocorrência de DTAs (doenças transmitidas por alimentos), além disso, o crescimento de microrganismos em alimentos pode vir a causar uma gama de modificações nos seus caracteres organolépticos conduzindo a um estado de impropriedade para o consumo humano (SOUZA, 2006).

Nos alimentos os conservantes são capazes de inibir, retardar ou deter o processo de fermentação, acidificação e outras deteriorações. São usados principalmente para manter as características (sabor, consistência e aparência) e o valor nutritivo dos alimentos (MARTINEZ [200-]). Dentre os antioxidantes sintéticos mais utilizados pela indústria brasileira estão: butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), galato de propila (PG) e *terc*-butil hidroquinona (TBHQ) (TAKEMOTO et al., 2009).

Porém, estudos toxicológicos apontam que determinadas concentrações de conservantes sintéticos e seu uso continuado, podem ser potencialmente tóxicos e terem efeitos carcinogênicos (RAMALHO; JORGE, 2006).

Assim, muitas pesquisas estão sendo dirigidas no sentido de encontrar compostos naturais com atividade antimicrobiana e antioxidante, que poderiam ser novas alternativas para substituir os conservantes sintéticos comumente utilizados ou também fazer associações entre eles, diminuindo sua quantidade em alimentos (VICTORIA, 2010).

Importante ressaltar que a maior ou menor efetividade antimicrobiana das especiarias apresenta-se dependente do tipo de especiaria, da sua concentração e do tipo e concentração do microrganismo alvo (MARINO, 2001 apud OLIVEIRA, 2010).

Porém, segundo Bagatini et al. (2007), a maioria das plantas não foi suficientemente estudadas, principalmente quanto à presença de substâncias

citotóxico-mutagênicas em sua composição ou decorrentes do próprio metabolismo, e que podem causar danos à saúde da população.

3.4. Propriedades Antioxidantes das Plantas

Diversas ervas e especiarias culinárias já foram relatadas por possuírem atividades antioxidantes, sugerindo, inclusive, potencial benéfico à saúde humana (PEREIRA, 2013). Os antioxidantes mais utilizados na indústria alimentícia que podem ser citados são: os tocoferóis, ácidos fenólicos e extratos de plantas como alecrim e sálvia (Lamiaceae) (BENZAQUEM, 2009).

O orégano, especiaria com sabor altamente favorável aos consumidores de todo o mundo, recebe destaque pelas propriedades antioxidantes (PITARO et al, 2012) devido a presença de compostos como carvacrol, flavonóides e terpenos, tais como apigenina, luteolina e derivados do fenilpropano (ARCILA-LOZANO et al., 2004)

As reações de oxidação no organismo humano têm sido associadas a diversos estados patológicos e doenças. Por outro lado, a ingestão de alimentos que contém produtos da oxidação lipídica também representa risco toxicológico crônico ao ser humano (KEHRER, 1993; FERRARI, 1998).

A oxidação é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células. Entretanto, o metabolismo do oxigênio nas células vivas leva à produção de radicais, também chamados de ERO (espécies reativas do oxigênio) (ROESLER et al., 2007).

De acordo com Barbosa et al. (2008) os danos causados pelas ERO nas moléculas ou no organismo como um todo é denominado estresse oxidativo (EO). A instalação do processo de EO decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos.

A oxidação lipídica em alimentos é caracterizada por uma sequência complexa de alterações químicas resultantes da interação de lipídeos com oxigênio. Durante reações de oxidação de lipídeos, os ácidos graxos esterificados em triacilgliceróis e fosfolipídeos decompõem-se, formando moléculas pequenas e voláteis que produzem os aromas geralmente indesejados, conhecidos como *rancidez oxidativa* (DAMODARAN et al., 2010).

Tsai et al (2005 apud DEL RÉ; JORGE, 2012) afirmam que a oxidação lipídica que ocorre nos produtos alimentares é uma das principais preocupações em tecnologia de alimentos. Pois, além de provocar odores e sabores desagradáveis nos produtos, pode ser responsável pela diminuição da segurança e qualidade nutricional, causados pela formação de compostos potencialmente tóxicos. A prevenção é economicamente importante e fundamental para a proteção da saúde humana.

Os antioxidantes apresentam-se como uma alternativa para prevenir a deterioração oxidativa dos alimentos e minimizar os danos oxidativos nos seres vivos. Como o emprego de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos tem sido alvo de questionamentos quanto à inocuidade, demonstrando a possibilidade desses antioxidantes apresentarem alguma toxidez (DEL RÉ; JORGE, 2012), pesquisas encontram-se voltadas para a busca de compostos naturais que exibam esta propriedade funcional (MELO; GUERRA, 2002 apud DEL RÉ; JORGE et al, 2012).

Assim, as pesquisas vem sendo realizadas com a finalidade de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, com destaque para as especiarias, pois podem ser adicionadas aos alimentos em várias formas, como especiarias inteiras ou como isolados dos extratos (HOSSAIN et al., 2010 apud PITARO et al., 2012).

Sobre o uso de antioxidantes naturais, importantes aspectos tecnológicos e nutricionais podem ser destacados, como a conservação da qualidade dos alimentos, podendo substituir os antioxidantes sintéticos; a preservação da saúde humana, ao minimizar danos oxidativos principalmente em algumas doenças e a presença de componentes bioativos, caracterizando os alimentos como funcionais (LAGOURI; NISTEROPOULOU, 2009; PITARO et al., 2012).

Com a diversidade existente no reino vegetal, o número de plantas potencialmente tóxicas é elevado. Portanto é importante ressaltar que muitas dessas plantas são completamente desconhecidas quanto ao potencial de causar intoxicações (BARBOSA et al., 2010).

3.5. Bioindicadores

Os testes (bioensaios) vegetais demonstram grande eficiência tanto no monitoramento de poluentes ambientais quanto na constatação da ação de compostos químicos derivados do metabolismo secundário das plantas (FERREIRA; AQUILA, 2000; SIMÕES et al., 2013).

Esses testes de toxicidade podem ser realizados através da utilização de bioindicadores, os quais são definidos como componentes biológicos, células, processos bioquímicos, estruturas e funções biológicas, alteradas quando em contato com compostos xenobióticos (ARIAS et al., 2007).

Dentre os diferentes sistemas vegetais podemos citar o teste de *Allium cepa*, o qual é um excelente bioindicador, devido ao seu baixo custo e confiabilidade, auxiliando os estudos de prevenção de danos à saúde humana (BAGATINI et al., 2007). É considerado uma ferramenta útil para a pesquisa básica do potencial genotóxico e citotóxico de produtos químicos, substâncias complexas como extratos de plantas, dejetos industriais e águas contaminadas (CUCHIARA et al., 2012).

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma espécie amplamente utilizada como planta bioindicadora (SOUZA FILHO et al., 2010; GOMES et al, 2012; RIBEIRO et al, 2012 apud SIMÕES, 2013) devido a sua sensibilidade à agentes químicos, rápida germinação, crescimento linear em ampla faixa de variação de pH e baixa sensibilidade aos potenciais osmóticos (ARAÚJO; MORAES et al., 2013).

Vários autores relatam a importância dos testes com vegetais na avaliação de riscos de toxicidade, pois apesar das diferenças entre o metabolismo de plantas e animais os resultados mutagênicos possuem alta

compatibilidade (HURTADO, 2013; BAGATINI, 2007; FISKESJO, 1994 apud MENEGUETTI et al., 2014).

O uso de ensaios biológicos para avaliação da bioatividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas tem sido frequentemente incorporado a identificação e monitoramento de substâncias potencialmente tóxicas (LUZ et al., 2012). Sendo capazes de detectar danos genéticos, que respondem em nível de DNA, cromossômico e genômico (BARBOSA et al., 2013).

Um bioensaio é baseado na habilidade de medir um parâmetro que responda a presença do composto testado. Tipicamente os parâmetros macroscópicos selecionados são: comprimento de parte aérea e da parte radicular (OLIVEIRA, 2009). Modificações do crescimento e desenvolvimento vegetal em resposta ao composto pode ser explicada por alterações moleculares da célula, tão bem como processos fisiológicos e bioquímicos (PINTO, 2015).

A análise de germinação e crescimento radicular em testes vegetais podem ser utilizadas na avaliação de toxicidade, tanto como testes preliminares para obtenção de dados iniciais, como também para desdobramento em pesquisas mais profundas (BARBOSA et al., 2013).

A citotoxicidade e a genotoxicidade de substâncias vem sendo verificada por uma gama de bioensaios sensíveis que expressam resultados satisfatórios conforme o agente a que são expostos (SOUZA et al., 2005). Segundo Bagatini et al., (2007), substâncias mutagênicas que causam alterações cromossômicas podem ser detectadas durante o ciclo celular de uma espécie.

Então, perfazendo os parâmetros microscópicos temos as avaliações de Índice mitótico, para a análise de taxa de divisão celular, as aberrações cromossômicas do tipo cromossomos em anel, pontes cromossômicas, cromossomos pegajosos, retardos cromossômicos (que ocorrem principalmente nas fases de metáfase e anáfase) e formação de micronúcleos atuam como indicadores de anormalidades no DNA (VANZETTO, 2014).

4. Materiais e métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética do Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética do Instituto de Biologia – Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) e o extrato utilizado foi preparado no Laboratório de pesquisa de produtos naturais do Instituto de Química – Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).

4.1. Obtenção do Extrato Etanólico de *Origanum vulgare* L.

A técnica de extração utilizada foi a maceração, utilizando-se 35g do material vegetal para cada 350mL de solvente (etanol). Esta mistura foi aquecida a uma temperatura de 70°C por 3h, após este tempo, a solução foi filtrada e este processo se repetiu por mais duas vezes, a fim de levar ao esgotamento do processo extrativo. Em seguida, o material foi submetido ao rotaevaporador (conforme figura 2) para que houvesse a evaporação do solvente, assim, obteve-se o extrato seco, que posteriormente foi diluído em água destilada.



Figura 2. Equipamento rotaevaporador. Pelotas, 2015.

4.2. Metodologia

Para montagem dos bioensaios foram utilizadas sementes de *Lactuca sativa* L. como planta teste (bioindicadora), sem fungicida, adquiridas no comércio local com poder germinativo de 99% e dentro do prazo de validade. Utilizando a balança analítica, o balão volumétrico contendo o extrato etanólico de orégano foi pesado (a fim de realizar o cálculo em mg), determinado 57mg de extrato, adicionado 100mL de água destilada esterilizada, assim obteve-se o extrato 100%, e então foram realizadas diluições expressas em % (50%, 25% e 12,5% de extrato etanólico de orégano) sendo 0% o grupo controle com água destilada esterilizada.

Após as diluições, caixas gerbox forradas com papel germitest foram umedecidas com 8mL do extrato (nas suas diferentes concentrações). As sementes foram acondicionadas nas caixas gerbox, e assim, o bioensaio foi preparado, utilizando as cinco concentrações do extrato (0; 100%; 50%; 25% e 12,5%) sendo, cinco repetições estatísticas de cem sementes para cada concentração. As caixas foram mantidas em câmara de germinação a uma temperatura controlada de 25°C (figura 3) e umedecidas diariamente com 2mL de água destilada.

O efeito do extrato etanólico sobre a germinação (GI e G) das sementes foi observado através dos testes de primeira contagem (germinação inicial - GI), realizada no período de quatro dias após a semeadura e a germinação final (G) avaliada aos sete dias após a semeadura, de acordo com as RAS (Brasil, 2009).

A análise do efeito fisiológico foi realizada com 10 plântulas de cada concentração, medindo-se o crescimento da parte aérea (CPA) e radicular (CPR) aos sete dias após a semeadura utilizando-se uma régua milimétrica.

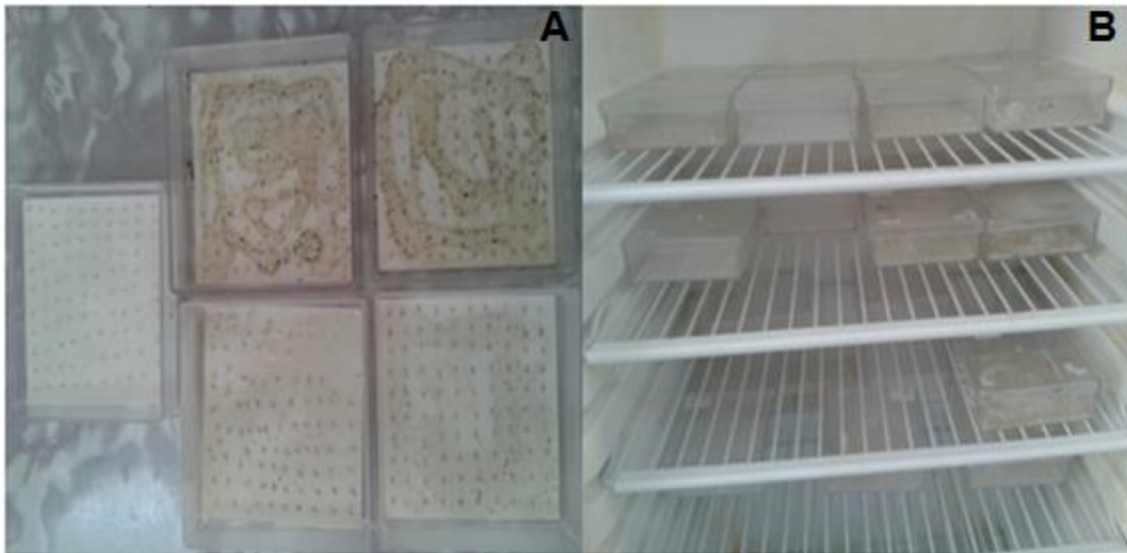


Figura 3. Montagem dos bioensaios. (A) Sementes de alface acondicionadas sobre papel germitest em gerbox contendo diferentes concentrações do extrato etanólico de orégano (B) Acondicionamento aleatório dos gerbox em câmara de crescimento a 25°C. Pelotas, 2015.

O efeito citotóxico foi verificado utilizando as variáveis índice interfásico e índice mitótico, através da contagem das fases de divisão mitótica das amostras obtidas a partir do tecido meristemático das pontas da raiz em cada uma das concentrações testadas. Assim como, através do índice de divisão por fases. Ainda, observou-se de forma qualitativa a presença de aberrações cromossômicas, como pontes anafásicas. Para análise citogenética foi usada a técnica de esmagamento de Guerra e Souza (2002), sendo as radículas coletadas aos quatro dias de germinação (GI) na presença do extrato, fixadas em Carnoy (3:1, etanol: ácido acético glacial), e mantidas por 24h a temperatura ambiente, depois transferidas para álcool 70% e mantidas a 4°C até a sua análise.

Para o preparo das lâminas as radículas foram lavadas por cinco minutos em água destilada e hidrolisadas em HCl 5N durante quinze minutos, posteriormente foram novamente lavadas em água destilada. Com o auxílio de microscópio estereoscópico, pinças e seringas de insulina, sobre lâmina, houve a retirada da coifa e das capas mais externas de cada raiz para após, realizar a coloração do tecido meristemático com orceína acética 2%.

A análise das fases se deu através de microscópio óptico com aumento de 400x, onde cada tratamento consistiu de quatro lâminas e foram observadas 100 células/lâmina pela técnica de varredura. Para verificação das variáveis índice interfásico e mitótico foram utilizadas as fórmulas:

$$II = \frac{\sum \text{células em interfase}}{\text{Número total de células analisadas}} \times 100$$

$$IM = \frac{\sum \text{células em divisão}}{\text{Número total de células analisadas}} \times 100$$

4.3. Análise Estatística

O experimento foi realizado com delineamento inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas a 5% de probabilidade pelo teste de Tuckey com auxílio do pacote estatístico Assistat 7.7.

5. Resultados e Discussão

A avaliação do efeito fisiológico do extrato etanólico através da germinação inicial e final demonstrou uma redução da germinação das plântulas de alface conforme aumento da concentração como apresentado na tabela 1. Esta diminuição na germinação foi estatisticamente significativa entre as concentrações testadas tanto para germinação inicial (GI) como para germinação total (G).

Tur et al (2010) também observaram que o aumento da concentração de extratos aquosos de folhas frescas de pingo-de-ouro (*Duranta repens* L.) provocou atrasos na velocidade de germinação de aquênios de alface.

De acordo com Ferreira e Aquila (2000) e Stein et al. (2008), a germinação é menos sensível que o crescimento das plântulas quanto ao efeito dos compostos majoritários, porém neste trabalho foi observado que tanto a germinação, em todas as concentrações, quanto o crescimento das plântulas, nas concentrações acima de 50%, foram afetados negativamente conforme aumento da concentração do extrato em comparação com o controle (Tabela 1).

Tabela 1. Análise do efeito fisiológico de diferentes concentrações do extrato etanólico de orégano sobre a germinação inicial (GI), germinação final (G) e sobre o crescimento da parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CPR). Pelotas, 2015.

Concentração	GI (%)	G (%)	CPA (cm)	CPR (cm)
0	99,3a	99,41 a	2,28 c	1,76 c
12,5%	92,1 b	93,05 b	3,24 a	3,35 a
25%	88,9 c	89,66 c	2,67 b	2,34 b
50%	76,98 d	79,81 d	1,50 d	0,9 d
100%	17,96 e	19,99 e	1,30 e	0,47 e

* Letras distintas nas colunas indicam diferença estatística significativa ao nível de 1% pelo teste de Tuckey

Quanto ao efeito do extrato etanólico sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas, os resultados mostram que tanto no crescimento de parte aérea (CPA) quanto no crescimento da parte radicular (CPR) houve uma variação significativa dos valores em todas as concentrações quando comparados ao controle (Tabela 1). Com isso, pode-se constatar que a parte aérea e o sistema radicular foram sensíveis aos compostos presentes no extrato utilizado nas concentrações a partir de 50%. Porém, para essas mesmas

variáveis, as concentrações de 12,5% e 25% quando comparadas com o controle estimularam o crescimento de CPA e CPR, mostrando que dependendo da quantidade de compostos ao qual a semente é submetida, o efeito pode ser positivo ou negativo. Segundo Souza Filho et al (1997 apud MAIA et al., 2013) a interferência no desenvolvimento do sistema radicular é um dos melhores indicadores para estudos de extratos.

Resultados similares foram observados por Malheiros et al. (2014) utilizando extratos de pacari onde em doses mais baixas houve estímulo no crescimento das plântulas de alface e concentrações mais altas o efeito foi inibitório.

Através da figura 4 podemos evidenciar as diferenças no estado fisiológico das plântulas germinadas nas diferentes concentrações do extrato etanólico de orégano, comparadas ao controle.

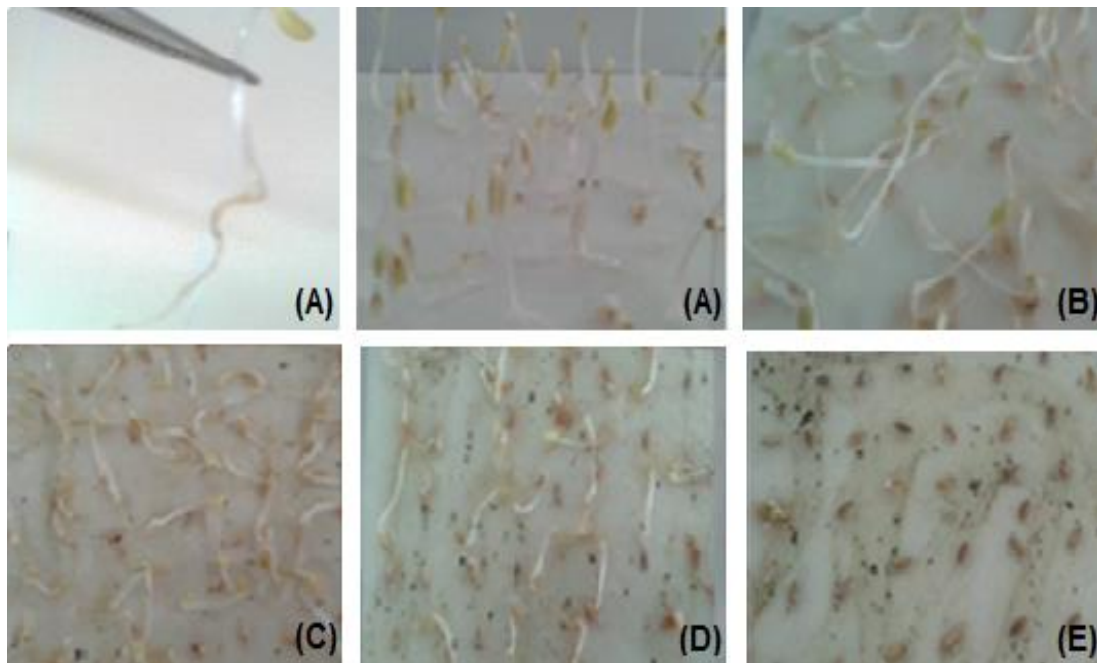
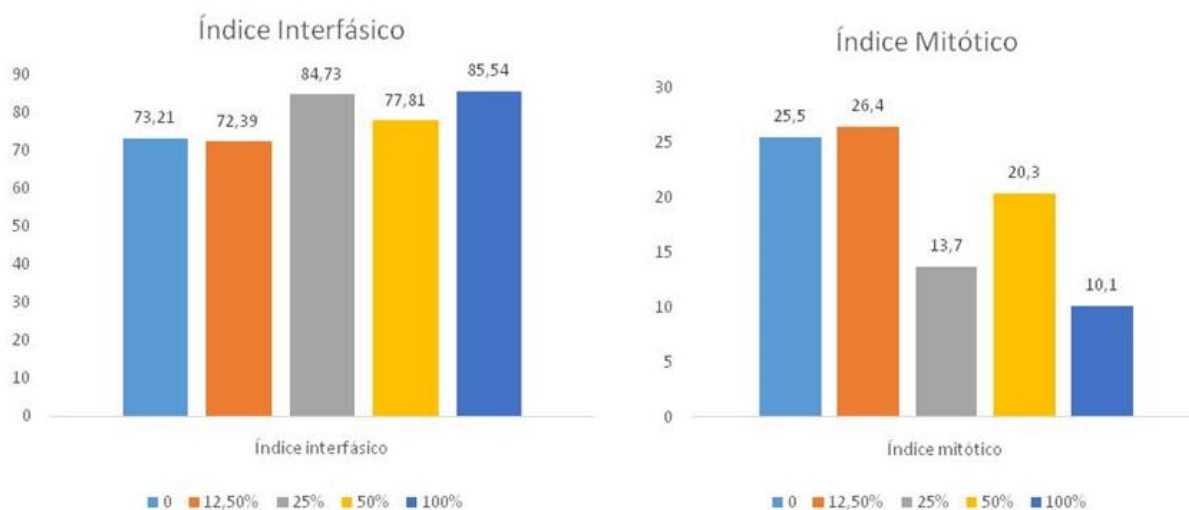


Figura 4. Efeito fisiológico do extrato etanólico de orégano em diferentes concentrações sobre a germinação das sementes de alface. (A) Controle; (B) 12,5%; (C) 25%; (D) 50% e (E) 100%. Pelotas, 2015.

Pelegrini e Cruz Silva (2012), ressaltam que a intensidade dos efeitos alelopáticos é dependente da concentração das substâncias. O que se comprovou neste trabalho. Reigosa et al. (1999 apud GATTI et al, 2004), explica este fato afirmando que os compostos secundários podem atuar em vários processos simultaneamente e ter uma resposta diferente para o mesmo ou para diferentes processos, dependendo da concentração deste composto.

A análise de índices mitóticos e de fases do ciclo de divisão celular têm sido usados como bons indicadores de proliferação ou antiproliferação das células (CONCEIÇÃO, 2010). Os resultados obtidos demonstraram que em relação ao efeito citotóxico, as concentrações testadas não diferiram significativamente em relação ao controle quanto ao índice interfásico nem em relação à análise do índice mitótico (Figura 5).

Figura 5: Efeito citotóxico das concentrações 12,5%, 25%, 50% e 100% do extrato etanólico de orégano em comparação ao controle analisado através do índice interfásico e do índice mitótico. Pelotas, 2015.



A citotoxicidade e 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 (SOUZA et al., 2005).

Quando analisados os índices de divisão por fases encontrou-se diferença estatisticamente significativa apenas para o índice metafásico como mostrado na tabela 2.

Na concentração 12,5% do extrato, observou-se um aumento de células nesta fase com relação às demais concentrações e ao controle. Além disso, houve uma relevante redução neste índice na concentração 100% do extrato.

De acordo com Alves (2008 apud OLIVEIRA et al., 2012) faltam informações sobre os riscos à saúde, decorrente do uso prolongado de doses repetidas de preparados à base de plantas medicinais. Oliveira et al. (2012) relata que existem muitos estudos científicos que comprovam a toxicidade de plantas antes usadas sem restrições e de forma indiscriminada, o desconhecimento por parte da população sobre a toxicidade de espécies utilizadas habitualmente pode trazer consequências graves à saúde dos seus usuários, o que mostra a importância de testes como os bioensaios.

Tabela 2. Análise do efeito citotóxico nas fases da mitose em análise pela técnica de varredura no microscópio óptico. Pelotas, 2015.

Concentração	Prófase	Metáfase**	Anáfase	Telófase
0	13,26	7,93 b	3,87	0,47
12,5%	11,09	8,57 a	4,79	1,93
25%	5,73	7,09 d	0,91	0,00
50%	10,26	7,15 c	1,84	1,08
100%	7,98	1,41 e	0,47	0,25

* Letras distintas nas colunas indicam diferença estatística significativa ao nível de 5% pelo teste de Tuckey

O efeito mitodepressivo observado quando analisado o índice metafásico segundo Ping (et al., 2012) sugere efeitos dos extratos sobre o ciclo de divisão

celular da alface, bloqueando a síntese de DNA ou inibindo a formação do fuso, com uma parada do processo em prófase ou redução da velocidade de progressão da célula através de mitose.

A incidência de mutações cromossômicas, como pontes anafásicas foram observadas de forma qualitativa nas concentrações 12,5 %, 25% e 50% (figura 6), porém, esses dados não foram submetidos à análise estatística.

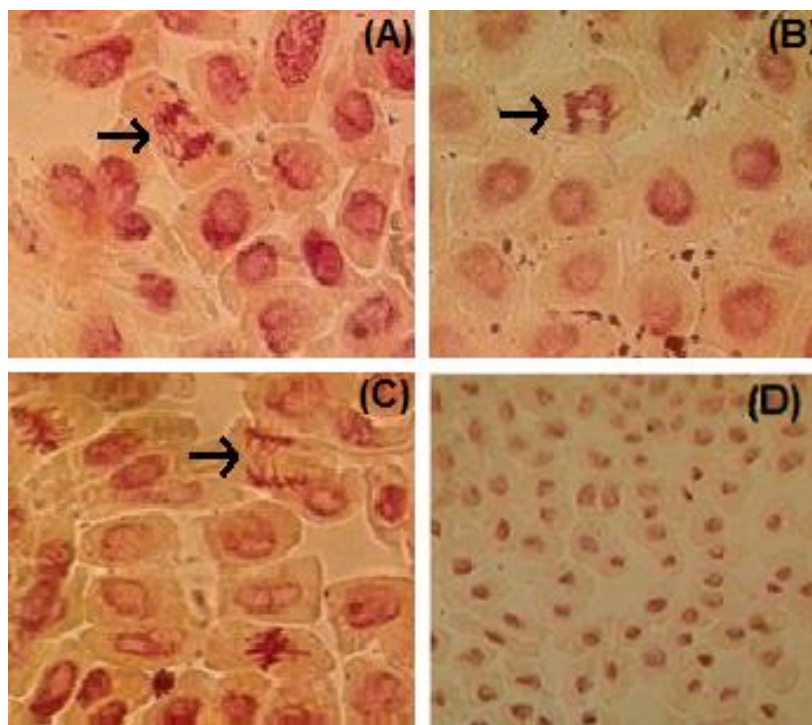


Figura 6: Fases da mitose observadas em células meristemáticas radiculares de alface em aumento de 400X, submetidas a diferentes concentrações do extrato etanólico de orégano: (A) 12,5%; (B) 25%; (C) 50%; (D) 100%. As setas indicam a presença de pontes anafásicas nas concentrações 12,5%, 25% e 50%.

Análises de aberrações cromossômicas fornecem informações importantes e podem ser consideradas um teste eficiente para investigar o potencial genotóxico dos tratamentos avaliados. Neste experimento visualizamos o aparecimento de pontes anafásicas, estas alterações ocorrem devido a ação dos extratos durante a formação do fuso acromático o que segundo Ping (et al., 2012), indica um possível efeito clastogênico causado por quebras de cromossomas.

6. Conclusões

Concluiu-se que o extrato etanólico de orégano em relação a germinação, apresenta um efeito fisiológico crescente, intervindo negativamente tanto na germinação inicial, quanto na germinação final das plântulas de alface.

Quanto ao efeito do extrato etanólico de orégano sobre o crescimento de parte radicular e aérea, verificou-se que o extrato nas concentrações menores exerce efeito estimulante enquanto nas concentrações maiores apresentou efeito inibitório sobre o bioindicador.

Em relação ao efeito citotóxico, concluiu-se que o extrato testado não demonstra alterações quanto aos índices interfásico e mitótico. Porém, observou-se uma redução no índice metafásico nas concentrações maiores.

7.Referências Bibliográficas

AFONSO, Anabela. **Análise de perigos: identificação dos perigos e avaliação dos riscos para a segurança alimentar, 2008.** Disponível em: <<http://www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-SEQUALI-05/Page%2026.pdf>>.

Acesso em: 12 de Agosto de 2015.

ALMEIDA, Luiz Fernando Rolim de. **Composição química e atividade alelopática de extratos foliares de *Leonurus sibiricus* L. (Lamiaceae). 2006. 96f** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – UNESP- Universidade Estadual Paulista, 2006.

ALVES. Patricia Alves Casae. Adubação orgânica e calagem no crescimento e nutrição de *Mentha arvensis* L. (LAMIACEAE) e produção do óleo essencial. **Dissertação** (Pós-graduação em Produção Vegetal) -Universidade Estadual de Santa Cruz-UESC, 2012.

AMSON, Gisele Van. et al. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciênc. Agrotec.**, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, nov./dez., 2006

ARAUJO; MORAES, R. M. et al. Padrão de germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (ASTERACEAE) exposta a diferentes concentrações de cobre. **Congresso** de pós-graduação da UFLA, 2013. Disponível em: <http://www.apg.ufla.br/resumos/resumo_2013/anais/resumo_4_288_1.pdf> Acesso em: 18 de Outubro de 2015.

ARCILA LOZANO, Cynthia Cristina, et al. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición.** Caracas, v.54 n.1, mar. 2004.

ARIAS, Ana Rosa Linde et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciênc. saúde coletiva**, v.12, n.1, pp. 61-72, 2007.

BAGATINI, Margarete Dulce et al. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Bras. farmacogn.** v.17, n.3, p. 444-447, 2007.

BALASUNDRAM, Nagendran et al. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.

BARBERÁN, F. T. et al. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 853-876, 2001.

BARBOSA, José da Silva. A Fitomedicina da Feira em Campina Grande-PB. **Revista Brasileira de Informações Científicas**, Campina Grande, v.1, n.1, abr./jun. 2010.

BARBOSA, K. B. F et al. Estresse oxidativo: avaliação de marcadores. **Nutrire: Revista. Soc. Bras. Alim.**, São Paulo, SP, v. 33, n. 2, p. 111-128, ago. 2008.

BARBOSA, R. M. et al. Competência do *Allium cepa* como modelo em bioensaios de fitotoxicidade. **Resumo I CONICBIO / II CONABIO / VI SIMCBIO (v.2)** Universidade Católica de Pernambuco - Recife - PE – Brasil, 2013

BENZAQUEN, Tovani. Os antioxidantes – **Food Ingredients Brasil nº 6**. p 16-30, 2009.

BORGES, A. M. et al. Determinação de óleos essenciais de alfavaca (*Ocimum gratissimum L.*), orégano (*Origanum vulgare L.*) e tomilho (*Thymus vulgaris L.*). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.14, n.4, p.656-665, 2012.

CONCEIÇÃO, Thelma da Silva. **Efeito antiproliferativo do chimarrão e do tererê (*Ilex paraguariensis*) sobre o ciclo celular de *Allium cepa***. 2010. Disponível em: <http://www.sbpnet.org.br/livro/62ra/resumos/resumos/4403.htm>

CORDEIRO, Tamires Silveira. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e Sálvia (*Salvia officinalis*) para aplicação em alimentos. 2013. 13f. **Trabalho de Conclusão de Estágio (Tecnologia de Alimentos)** – Universidade do Extremo Sul Catarinense, 2013.

CORRÊA, R. M. et al. Adubação orgânica na produção de biomassa de plantas, teor e qualidade de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare L.*) em cultivo protegido. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v.12, n.1, p. 80-89. jan./mar. 2010.

CUCHIARA, Cristina Copstein et al. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água. **Tecnologia, Ciência e Agropecuária**, v.6, n.1, p.33-38, 2012.

DAMODARAN, Srinivasan et. al. **Química de alimentos de Fennema**. 2010. Disponível em: <<https://books.google.com.br>> Acesso em: 22 de Setembro de 2015.

DELBONE, Camila Aparecida Castelani. Importância ecológica e evolutiva dos principais grupos de metabólitos secundários nas espécies vegetais. 2010. Congresso de Educação do Norte Pinheiro, Jacarezinho, 2010. **Anais** -UENP- Universidade Estadual do Norte do Paraná p.396-404.

DEL RE, P.V; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Bras. plantas med.** v.14, n.2, p. 389-399. 2012.

DORMAN, D, J. H et. al. Antimicrobial agentes from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p.308-316, 2000.

EVANGELISTA, L. C. **Prospecção fitoquímica do extrato aquoso e hexânico das folhas da *Lavandula officinalis*.** 2012. Disponível em: <<http://propi.ifto.edu.br/ocs/index.php/connepi/vii/paper/viewFile/4886/1580>> Acesso em: 12 de Agosto de 2015.

FERRARI, Carlos Kusano Bucalen. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. **Revista Nutr.**, Campinas, v.11, n.1, p. 3-14, jan./jun., 1998.

FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.175-204, 2000.

FONSECA, Ana Valquíria Vasconcelos da. Estabilidade do suco de caju (*Anacardium occidentale*, L) acondicionado em embalagens de vidro e de pet. 2010, 91f. **Dissertação** (Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, 2010.

FORMAGIO, Anelise Samara Nazari. et al. Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 4, p. 349-354, out./dez. 2010.

FUKAYAMA, Ellen Hatsumi. et al. Extrato de Orégano como Aditivo em Rações para Frangos de Corte. **Revista Bras. Zootec.**, v.34, n.6, p.2316-2326, 2005.

FURLAN, Cláudia Maria. **Potencial químico e farmacológico de extratos de *Hyptis Jacq.* (Lamiaceae).** 2014. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/84714/potencial-quimico-e-farmacologico-de-extratos-de-hyptis-jacq-lamiaceae/>> Acesso em: 07 de Setembro de 2015.

FRESCURA et al. Compostos fenólicos em extratos de *Rosmarinus officinalis* L. sob cultivo fora do solo. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.17; p.755-761, 2013.

GANDRA, Eliezer A et al. Potencial antimicrobiano e antioxidante de extratos vegetais de alecrim, erva doce, estragão e orégano. **Revista. cienc. tecnol.** n.20, p. 24-29. 2013,

GATTI, Ana Beatriz et al. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L.. **Acta Bot. Bras.**, v.18, n.3, p. 459-472, 2004.

GUERRA, M; SOUZA. **Como observar cromossomos: Um Guia de Técnicas em Citogenética Vegetal, Animal e Humana**. São Paulo: FUNPEC. 2002.131p.

GERSHENZON J. et al. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint (*Mentha 3 piperita* L). **Plant Physiol**, v. 122, p. 205-213, 2000.

KEHRER, James P. Free Radicals as Mediators of Tissue Injury and Disease. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 23, n. 1,, p.21-48, 1993.

LIMA, R.K. Família Lamiaceae: Importantes Óleos Essenciais com Ação Biológica e Antioxidante. **Revista Fitos**, v.3, n.3, p 14-24, set/2007.

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

MAIA, Sandra Sely Silveira et al. Atividade biológica de extratos de espécies do Rio Grande do Norte em sementes de alface. **Revista Verde**. Mossoró, v. 8, n.4, p.169 - 173, out-dez, 2013.

MALHEIROS, R. S. P et al. Atividade alelopática de extratos de *Lactuca sativa* L. e *Zea mays* L. em condições de laboratório. **Revista Bras. de Agroecologia**, v. 9, n. 1, p. 85-194, 2014.

MARTINEZ, M. **Conservantes. Info escola – Navegando e aprendendo**. [200-]. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/bioquimica/conservantes/>> Acesso em: 05 de Setembro de 2015.

MAZZAFERA, Paulo. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Rev. Bras. Bot.**, São Paulo, v.26, n.2, p. 231-238. 2003.

MENEGUETTI, Dionatas Ulises de Oliveira et al. Análise Citotóxica e Mutagênica do Extrato Aquoso de *Maytenus guayanaensis* Klotzsch Ex Reissek (*Celastraceae*) Chichuá (*Xixuá*) Amazônico. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 36, n. 3, set-dez., p. 301– 309, 2014.

MÜZELL, Denise Pereira. Propriedades biológicas de extratos de *melissa officinalis* L. (Lamiaceae) em ratos wistar. **Dissertação** (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2006.

NETO. Leonardo Gobbo.; LOPES Norberto. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quím. Nova**, São Paulo, v.30, n.2, p. 374-381. Mar./Apr., 2007.

NOBUYOKI, I. et al. Antioxidants: carcinogenic and chemopreventive properties. **Encyclopedia of Cancer**, v.1, n.1, p.89-101, 2003.

NUNES, João Paulo Silva. **Análise do potencial fungitóxico de orégano, *Origanum vulgare*, no crescimento de fungos fitopatógenos.** 2010. Disponível em: <<http://congressos.ifal.edu.br/index.php/connepi/CONNEPI2010/paper/viewFile/1330/868>> Acesso em: 12 de Agosto de 2015.

OLIVEIRA, Carlos Eduardo Vasconcelos de. Influência de timol e carvacrol sobre o crescimento, características metabólicas e potencial enterotoxigênico de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de alimentos. 2010. 114f. **Dissertação** (Pós-graduação em Nutrição) – Universidade Federal de Pernambuco, 2010

OLIVEIRA, Elisa Pires de. et al. Determinação do efeito alelopático, índice mitótico e utilização do boldo, capim-cidreira e hortelã no bairro boa vista em madaguari (PR). **Diálogos & Saberes, Mandaguari**, v. 8, n. 1, p. 41-53, 2012.

OLIVEIRA, Sara Christina Caldas. **Estudo alelopático de espécies do gênero *Solanum* do Distrito Federal.** 2009. 163f Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Carlos, 2009.

PANIZZA, S. T. et al. **Fitoterapia & Terapias complementares.** [200-] Disponível em:<http://www.fitoterapia.com.br/portal/index.php?option=com_content&task=view&id=317> Acesso em: 18 de Agosto de 2015.

PELEGRINI, L. L., CRUZ SILVA, C. T. A Variação sazonal na alelopatia de extratos aquosos de *Coleus barbatus* (A.) Benth. sobre a germinação e o

desenvolvimento de *Lactuca sativa* L. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.14, n.2, p.376-382, 2012.

PEREIRA, Danusa Cassiano. Efeito antioxidante de extrato de pimenta em óleo de soja sob diferentes condições de estocagem. 86f 2013. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista, 2013.

PEREIRA, Marcelo Cláudio. et. al. Inibição do desenvolvimento fúngico através da inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciênc. agrotec.**, v. 30, n. 4, p. 731-738, jul./ago., 2006.

PERES. P. L. E. **Metabolismo secundário das plantas**. 2004 Disponível em: <<http://www.oleosessenciais.org/metabolismo-secundario-das-plantas/>> Acesso em: 22 de Agosto de 2015.

PERON, Francieli et al. Efeitos alelopáticos de extratos de tabaco sobre o desenvolvimento inicial de soja. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.9, n.1, p.53-60, jan./abr., 2014.

PING, K. Y. et al. Genotoxicity of Euphorbia hirta: An Allium cepa Assay, **Molecules**, v. 17, n.7, p.7782-7791; 2012.

PINTO, Gisele Fernanda de Souza. Fitotoxicidade e análise fitoquímica a partir de folhas de cinco espécies de Cerrado. 2015. 66f. **Dissertação** (Mestrado em Biociências) - Universidade Estadual Paulista, 2015.

PITARO, S.P et al. Potencial antioxidante dos extratos de manjeriço (*Ocimum basilicum* Lamiaceae) e orégano (*Origanum vulgare* Lamiaceae) em óleo de soja. **Rev. Bras. plantas med.**, v.14, n.4, p. 686-691. 2012.

RAMALHO, Valéria Cristina; JORGE, Neuza. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RIBEIRO, Joselito Nardy et. al. Avaliação dos parâmetros sanguíneos de hepatotoxicidade em coelhos normais submetidos a tratamentos com antocianina e antocianina + naringenina. **RBAC**, v. 38, n.1, p. 23-27, 2006.

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

ROESLER, Roberta et. al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciênc. Technol. Aliment.** Campinas, v. 27, n. 1, p. 53-60, jan-mar. 2007.

SANTOS, Alda Ernestina. Avaliação do potencial antioxidante e caracterização química das frações cromatográficas e extrato etanólico das folhas de *Bauhinia longifolia*. 2008. **Trabalho** (Licenciatura em Química)- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras do Alto São Francisco – FASF, 2008.

SANTOS, Vinicius Borges dos, et al. **Produção hidopônica de orégano (*Origanum vulgare*) e agrião da terra (*Barbarea verna*), em diferentes concentrações de solução nutritiva.** 2006. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/horizontecientifico/article/viewFile/4128/3075>> Acesso em: 15 de Agosto de 2015.

SCHUCH, T. L. Avaliação da toxicidade reprodutiva do óleo essencial de orégano 3% (*Origanum Vulgare L.*) em ratos wistar. **Salão de Iniciação Científica** (22.: 2010 out. 18-22 : Porto Alegre, RS). Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2010.

SIMÕES, Mateus Salomão. Padronização de bioensaios para detecção de compostos alelopáticos e toxicantes ambientais utilizando alface. **Revista Biotemas**, v. 26, n. 3, p. 29-36, setembro, 2013.

SOUZA, Evandro Leite de. Potencial antimicrobiano do óleo essencial de orégano (*Origanum Vulgare L.*): Uma abordagem para uso em sistemas de conservação de alimentos. 2006, 141f. **Tese** (Graduação em Nutrição) – Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

SOUZA FILHO, A. P. S. et al. Sementes como fonte alternativa de substâncias químicas com atividade alelopática. **Planta daninha**. Viçosa, v.29, n.3, July/Sept., 2011.

SOUZA, Mariana Albuquerque. Boas práticas para padarias e confeitarias. 2012. 53f. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SOUZA, S. A.M. et al. Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação do efeito citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, p.3-9, 2005.

STEIN, V.C et al. Atividade alelopática de extratos aquosos de diferentes espécies de *Plantago L.* **Revista Verde**. Mossoró, v.1, n.3,146-150, janeiro/março de 2008

TAKEMOTO, Emy et al. Validação de metodologia para a determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por CLAE/UV. **Quím. Nova.** v.32, n.5, p. 1189-1194. 2009.

TUR, Célia Maria et al. Alelopatia de extratos aquosos de *Duranta repens* sobre a germinação e o crescimento inicial de *Lactuca sativa* e *Lycopersicum esculentum*. **Revista Biotemas**, v. 23, n.2, p. 13-22, junho de 2010.

VANZETTO, Guilherme Victor. A utilização de bioindicadores para avaliar o potencial mutagênico e citotóxico das águas do rio Pirapó, região norte do Paraná, Brasil, 2014. 39f. **Monografia** (Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2014.

VICTORIA, Francine Novack. Novos Compostos Organosselênio Bioativos: Estudo da Ação Antimicrobiana Frente à Pat Patógenos de Importância em Alimentos. 2010. 85f. **Dissertação** (Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Universidade Federal de Pelotas.