

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

VÂNIA TOMAZELLI DE LIMA

Produtividade, composição química e atividade biológica de *Ocimum
kilimandscharicum* Guerke.

DOURADOS-MS
2014

VÂNIA TOMAZELLI DE LIMA

Produtividade, composição química e atividade biológica de *Ocimum
kilimandscharicum* Guerke.

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral/Bioprospecção para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Bioprospecção

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Vieira

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

L732p	<p>Lima, Vânia Tomazelli de. Produtividade, composição química e atividade biológica de <i>Ocimum kilimandscharicum</i> Guerke. / Vânia Tomazelli de Lima. – Dourados, MS : UFGD, 2014. 60f.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Maria do Carmo Vieira. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral/Bioprospecção) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Alfavaca-azul-africana. 2. Atividades biológicas. 3. Óleo essencial. 4. Resíduo orgânico. I. Título.</p> <p>CDD – 660.63</p>
-------	--

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

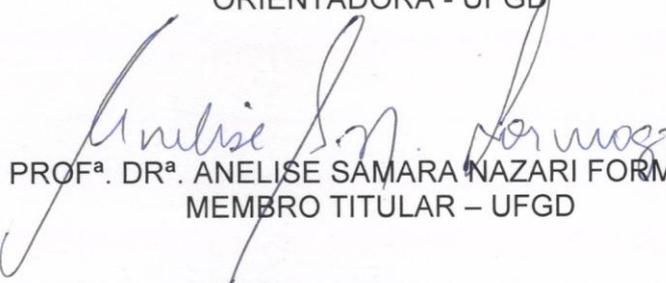
“PRODUTIVIDADE, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Ocimum kilimandscharicum* Guerke”.

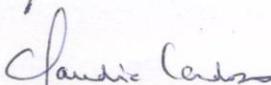
POR

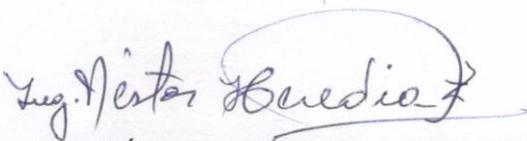
VÂNIA TOMAZELLI DE LIMA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS (UFGD), COMO PARTE DOS REQUISITOS EXIGIDOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA GERAL - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: “BIOPROSPECÇÃO”.


PROF^a. DR^a. MARIA DO CARMO VIEIRA
ORIENTADORA - UFGD


PROF^a. DR^a. ANELISE SAMARA NAZARI FORMAGIO
MEMBRO TITULAR - UFGD


PROF^a. DR^a. CLAUDIA ANDREA LIMA CARDOSO
MEMBRO TITULAR - UEMS


PROF. DR. NÉSTOR ANTONIO HEREDIA ZÁRATE

*Aos meus pais,
José de Lima (Saudade eterna) e Maria Tomazelli de Lima, por tudo o que sou.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido e amado Deus, pela força para suportar os momentos difíceis ao longo desses dois anos e pela coragem para enfrentar os desafios.

À minha família, minha base, meu refúgio, pelo apoio, incentivo e compreensão.

Ao meu amado Antonio Luiz Viegas Neto, pelo apoio, compreensão, palavras de incentivo e esclarecimentos da área agrônômica.

À Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação em Biologia Geral/Bioprospecção.

À Capes, pela bolsa concedida.

À professora Dr^a. Maria do Carmo Vieira, pela orientação, dedicação, amizade e por ter acreditado em mim.

Aos professores Dr^a. Anelise Samara Nazari Formagio, pela co-orientação e amizade e ao Dr. Néstor Antonio Heredia Zárate, pelos ensinamentos e palavras de incentivo.

Ao grupo de pesquisa em Olericultura e Plantas Medicinais, pela ajuda nos trabalhos de campo, em especial, gostaria de agradecer à Jucilene Martins Alves, Willian Vieira Gonçalves e Heldo Denir Vhaldor Rosa Aran, que sempre estiveram comigo durante esses dois anos e não mediram esforços para me ajudar. Obrigada pela amizade de vocês e pelos momentos de alegria e descontração.

Aos funcionários do Horto de Plantas Medicinais, pelo auxílio nos trabalhos de campo.

Ao Dr. Thiago de Oliveira Carnevali, pela ajuda nas análises estatísticas e pela amizade.

Ao Dr. Roberto Fontes Vieira da Embrapa-Cenargen de Brasília-DF, pela doação das sementes de *Ocimum kilimandscharicum*.

Aos meus amigos da CBPAZ pelas orações, palavras de incentivo e amizade.

MUITO OBRIGADA!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO GERAL

LIMA, V.T. **Produtividade, composição química e atividade biológica de *Ocimum kilimandscharicum* Guerke**. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral/Bioprospecção) – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS, 2014.

Objetivou-se avaliar a produtividade de biomassa, o rendimento e a composição química do óleo essencial da alfavaca azul africana em resposta à adição ao solo da cama de frango e do fósforo e avaliar a atividade biológica do óleo essencial da planta. Foram avaliadas cinco doses de cama de frango semidecomposta (0, 5, 10, 15 e 20 t ha⁻¹) sem e com a adição de fósforo (200 kg ha⁻¹ P₂O₅), incorporados ao solo. Os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial 5 x 2, em delineamento experimental blocos casualizados, com quatro repetições. Foram feitos dois cortes das plantas, sendo o primeiro aos 70 dias após o transplante - DAT e o segundo (correspondente à rebrota) aos 140 DAT. A maior área foliar, massa fresca e seca de folha, massa fresca e seca de caule e massa fresca e seca de inflorescência foram obtidas quando se utilizaram 20 t ha⁻¹ de cama de frango. As maiores produções de massas frescas e secas de folhas, caules e inflorescências e área foliar foram obtidas no segundo corte. O maior rendimento (14,30 L ha⁻¹) do óleo essencial das folhas foi obtido com o uso de 20 t ha⁻¹ de cama de frango. A composição química do óleo essencial por CG-EM apresentou 45 compostos, destacando-se como majoritários a cânfora, limoneno e 1,8 cineol. Concluiu-se que a maior produção de biomassa e o rendimento do óleo essencial foram obtidos com o uso de 20 t ha⁻¹ de cama de frango e a maior produção de biomassa foi obtida no segundo corte. Os compostos majoritários encontrados no óleo essencial das folhas de alfavaca azul africana foram a cânfora, limoneno e 1,8 cineol. O óleo essencial apresentou alta capacidade “sequestradora” de radicais livres, seletividade frente à célula de ovário (OVCAR-3) e redução da migração celular, na dose de 30 e 100 mg kg⁻¹, podendo ser associada com a presença de monoterpenos.

Palavras-chave: Alfavaca azul africana, atividades biológicas, óleo essencial, resíduo orgânico.

GENERAL ABSTRACT

LIMA, V.T. **Productivity, chemical composition and biology activity of *Ocimum kilimandscharicum* Guerke.** Dissertation (Master in General Biology/Bioprospection) – Faculty of Biologic Science and Environmental, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS, 2014.

The aim was to evaluate the biomass productivity, the yield and the chemical composition of the basil-blue-African as an answer to the addition of poultry bed and the phosphorus to evaluate the biological activity of the oil in the plant. It was evaluated five poultry bed semi decomposed (0, 5, 10, 15 e 20 t ha⁻¹) with and without addition of phosphorus (200 kg ha⁻¹ P₂O₅), incorporated to the soil. The treatments were arranged in factorial scheme 5x2, in experimental delineation in casual blocks, with four repetitions. It was done four cuts on the plants, being the first 70 DAT (days after transplant) and the second (referred to the new shoots) on 140 DAT. The biggest area foliar, fresh and dry mass of leaf, fresh and dry mass of stem and fresh and dry mass of inflorescence were obtained when it was used 20 t ha⁻¹ of poultry bed. The biggest productions of fresh and dry mass of leaves, steam and inflorescence and foliar area were obtained on the second cut. The biggest yield (14.30 L ha⁻¹) of the essential oil of the leaves was obtained using 20 t ha⁻¹ of poultry bed. The chemical composition of the essential oil by GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry) presented 45 compounds, highlighting as the biggest the camphor, limonene and 1.8 eucalyptol. It was concluded that the largest production in mass and the yield of the essential oil were obtained by the use of 20 t ha⁻¹ of poultry bed and the largest production of biomass was obtained on the second cut. The major compounds found in the essential oil of the basil-blue-African leaves were camphor, limonene and 1.8 eucalyptol. The essential oil showed high capacity of seizing the free radicals, selectivity in regard of the ovary cell (OVCAR-3) and reduction of the cellular migration, in a dose of 30 and 100 mg kg⁻¹, which can be associated to the presence of monoterpene.

Key-word: Basil-blue-African, biological activities, essential oil, organic residue

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	xi
GENERAL ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS	2
CAPÍTULO 1. PRODUTIVIDADE, TEOR DE MACRONUTRIENTES E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE <i>Ocimum kilimandscharicum</i> Guerke. CULTIVADA EM SOLO COM CAMA DE FRANGO E FÓSFORO.	3
Resumo	3
Abstract.....	4
1 Introdução	5
2 Material e Métodos	6
3 Resultados e Discussão.....	13
4 Conclusão	26
Referências	27
CAPÍTULO 2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Ocimum kilimandscharicum</i> Guerke.	31
Resumo	31
Abstract.....	32
1 Introdução	33
2 Material e Métodos	34
3 Resultados e Discussão.....	37
4 Conclusão	42
Referências	43
CONCLUSÃO GERAL	46
REFERÊNCIAS	47

INTRODUÇÃO GERAL

O estudo de espécies vegetais tem sido contínuo tema de pesquisas devido à grande aplicação de substâncias naturais em diversas áreas, podendo-se destacar a utilização destas no campo farmacêutico e agrícola. A busca por medicamentos fitoterápicos vem crescendo, devido ao grande interesse da população por terapias alternativas (FERREIRA e PINTO, 2010). No Brasil, cerca de 82% da população utiliza produtos à base de plantas medicinais nos seus cuidados com a saúde. Embora o número de pesquisas com plantas medicinais tenha aumentado, apenas pequena percentagem tem sido investigada fitoquimicamente, fato que ocorre também em relação às propriedades farmacológicas, nas quais, em muitos casos, existem apenas estudos preliminares (BRASIL, 2012). Portanto, é de suma importância que pesquisas, com plantas medicinais, abrangendo essas áreas sejam realizadas.

O gênero *Ocimum* compreende aproximadamente 150 espécies e tem distribuição geográfica por todas as regiões de clima tropical e subtropical (SIMON, QUINN, e MURRAY, 1990). Algumas espécies têm sido relatadas com potencial atividade anti-inflamatória (NAVIN *et al.*, 2013), antitripanossoma (ADELODUN *et al.*, 2013), antioxidante, antimicrobiana (JOSHI, 2013), anticâncer (EKUNWE *et al.*, 2013) e inseticida (BEKELE *et al.*, 2001). O gênero *Ocimum* é importante grupo de plantas aromáticas que produzem óleo essencial rico em constituintes como ácidos fenólicos, linalol, geraniol, citral, canfora, eugenol, timol, 1,8-cineol, e outros compostos. Estes compostos, por sua vez, apresentam as mais variadas atividades farmacológicas, tais como bactericida, fungicida, antiparasitária, anti-inflamatória e, até mesmo, como repelente de insetos (GOVIN *et al.*, 2000).

O teor dos fitoquímicos em vegetais pode ser influenciado por vários fatores, dentre eles, os genéticos, tratos culturais e condições ambientais. Dentre esses fatores, a adubação merece destaque, pois pode contribuir para a maior produção de biomassa e de metabólitos secundários.

Logo, estudos agronômicos, químicos e biológicos da alfavaca azul africana são de grande importância, pois a adubação pode aumentar a produção de biomassa e o teor de constituintes químicos da planta. A avaliação da composição química surge como resposta aos testes biológicos a serem desenvolvidos e os testes biológicos permitem avaliar a eficácia da planta. Assim, propôs-se o estudo de produção, composição química e atividade biológica da alfavaca azul africana.

OBJETIVOS

Geral:

Estudar a *Ocimum kilimandscharicum* procurando contribuir para a ampliação do conhecimento agrônomo, químico e biológico.

Específicos:

Avaliar o efeito de diferentes doses de cama de frango combinadas com fósforo na produtividade de biomassa e no teor de macronutrientes nas folhas de *Ocimum kilimandscharicum*.

Avaliar o rendimento, a composição química e a atividade antioxidante, antiproliferativa e anti-inflamatória do óleo essencial das folhas de *Ocimum kilimandscharicum*.

Capítulo 1

Produtividade, teor de macronutrientes e composição química do óleo essencial de folhas de *Ocimum kilimandscharicum* Guerke. cultivada em solo com cama de frango e fósforo

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da cama de frango e do fósforo sobre a produção de biomassa, teor de macronutrientes das folhas e composição química do óleo essencial das folhas de alfavaca azul africana, em Dourados-MS. Foram avaliados o efeito da incorporação ao solo de cinco doses de cama de frango semidecomposta (0, 5, 10, 15 e 20 t ha⁻¹), sem e com a adição de fósforo (200 kg ha⁻¹ P₂O₅). Os tratamentos foram arrançados em esquema fatorial 5 x 2, em delineamento experimental blocos casualizados, com quatro repetições. Foram feitos dois cortes das plantas, sendo o primeiro aos 70 dias após o transplante - DAT e o segundo (correspondente à rebrota) aos 140 DAT. Maiores alturas de plantas foram obtidas com o uso do fósforo (22,62 cm), comparados com o não uso (19,37 cm), no primeiro corte. A maior altura de planta no segundo corte foi obtida com o uso da cama de frango na dose de 15 t ha⁻¹. O maior valor do índice SPAD no primeiro corte foi observado com a dose de 15 t ha⁻¹ de cama de frango, com o uso do fósforo, aos 40 DAT. No segundo corte, o maior valor de índice SPAD foi observado aos 140 DAT. As maiores área foliar, massa fresca e seca de folha, massa fresca e seca de caule e massa fresca e seca de inflorescência foram obtidas nas plantas cultivadas em solo com adição de 20 t ha⁻¹ de cama de frango. As maiores produtividades de massas frescas e secas de folhas, caules e inflorescências e área foliar foram obtidas no segundo corte. Os maiores teores de cálcio e magnésio foram obtidos com a dose de 15 t ha⁻¹ de cama de frango no primeiro corte e os maiores teores de potássio, nitrogênio e fósforo foram obtidos no primeiro corte. O maior rendimento (14,30 L ha⁻¹) do óleo essencial das folhas foi observado com o uso de 20 t ha⁻¹ de cama de frango. A composição química do óleo essencial por CG-MS apresentou 45 compostos, destacando-se como majoritários a cânfora, limoneno e 1,8 cineol. Concluiu-se que a adição ao solo de cama de frango na dose 20 t ha⁻¹ aumentou a produção de biomassa e o rendimento do óleo essencial das folhas de alfavaca azul africana, e a maior produção de biomassa foi obtida no segundo corte. Os maiores teores de cálcio e magnésio foram obtidos com a dose de 15 t ha⁻¹ de cama de frango, e os teores de potássio, nitrogênio e fósforo foram maiores no primeiro corte. Os compostos majoritários encontrados no óleo essencial das folhas de alfavaca azul africana foram a cânfora, limoneno e 1,8 cineol.

Palavras-chave: Adubação orgânica e mineral, alfavaca azul africana, óleo essencial.

Productivity, macronutrients proportion and chemical composition of the essential oil of *Ocimum kilimandscharicum* Guerke leaves cultivated on soil with poultry bed and phosphorus.

ABSTRACT

The aim was to evaluate the effect of the poultry bed and phosphorus on the biomass production, proportion of macronutrients of the leaves and chemical composition of the essential oil in basil-blue-African leaves, in Dourados-MS. It was evaluated the effect of the incorporation to the soil of five portions of poultry bed semi decomposed (0, 5, 10, 15 e 20 t ha⁻¹), with and without phosphorus addition (200 kg ha⁻¹ P₂O₅). The treatments were arranged in a factorial scheme 5x2, in experimental delineation in casual blocks with four repetitions. It was made two cuts on the plants, being the first one 70 days after the transplant (DAT) and the second one (referred to the new shoots) on 140 DAT. The highest height of the plants was obtained with the use of phosphorus (22.62 cm), compared to the non-use of it (19.37 cm), on the first cut. The highest height of the plant on the second cut was obtained with the use of poultry bed in a proportion of 15 t ha⁻¹. The biggest value of the indices SPAD- Soil Plant Analyzer Develop on the first cut was observed in a proportion of 15 t ha⁻¹ of poultry bed, using phosphorus 40 DAT. On the second cut, the highest value of SPAD indices was observed 140 DAT. The biggest foliar area, fresh and dry mass of the leave, fresh and dry mass of the steam and fresh and dry mass of the inflorescence were obtained on plants that were cultivated on soil with addition of 20 t ha⁻¹ of poultry bed. The biggest productivities of fresh and dry mass of leaves, steam and inflorescences and foliar area were obtained on the second cut. The highest proportion of calcium and magnesium were obtained with 15 t ha⁻¹ of poultry bed on the first cut and the highest proportion of potassium, nitrogen and phosphorus were obtained on the first cut. The biggest yield (14.30 L ha⁻¹) of the essential oil of the leaves was observed using 20 t ha⁻¹ poultry bed. The chemical composition of the essential oil by GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry) presented 45 compounds, highlighting as the biggest the camphor, limonene and 1.8 eucalyptol. It was concluded that the addition of poultry bed to the soil in a proportion of 20 t ha⁻¹ increased the biomass production and the yield of the essential oil of the basil-blue-African leaves, and the biggest yield of biomass was obtained on the second cut. The highest level of calcium and magnesium were obtained using 15 t ha⁻¹ of poultry bed, and the level of potassium, nitrogen and phosphorus were bigger on the first cut. The major compounds found on essential oil of the basil-blue-African leaves were camphor, limonene and 1.8 eucalyptol.

Key-words: Organic and mineral fertilization, basil-blue-African, essential oil.

1 INTRODUÇÃO

Ocimum kilimandscharicum Guerke. (Lamiaceae), conhecida popularmente por “alfavaca azul africana” e “kilimanjaro”, é nativa da África Oriental e tem sido cultivada em várias partes do mundo. É um arbusto lenhoso, podendo atingir 2 m de altura em regiões temperadas, sendo propagada tanto por sementes quanto vegetativamente. Suas sementes são negras, pequenas, e uma vez que o arbusto é estabelecido, ele pode ser colhido três vezes por ano, por mais de três anos (KHARE, 2007; DOLLY *et al.*, 2012). Para propagação e desenvolvimento inicial de mudas de *O. kilimandscharicum*, Lima *et al.* (2012) recomendam o uso de substrato comercial Bioplant[®] puro ou composto com solo (50%).

A alfavaca azul africana possui potencial terapêutico, sendo utilizada na medicina tradicional como estimulante digestivo, no tratamento de insônia, constipação, dores abdominais, diarreia e sarampo. A infusão feita com as folhas e a inalação do vapor tratam peito congestionado, tosse e resfriado (KASHYAP *et al.*, 2011). O óleo essencial possui ação repelente (JEMBERE *et al.*, 2001), antibacteriano (VERMA *et al.*, 2011) e antifúngico (NARWAL *et al.*, 2011).

A maior parte dos estudos, com alfavaca azul africana, como os de Tewari *et al.* (2012), Bekele *et al.* (2001), Kweka *et al.* (2009), Saha *et al.* (2010) e Kumar *et al.* (2011), referem-se à composição química do óleo essencial e/ou avaliação da atividade biológica, sendo poucos os estudos agronômicos com essa espécie, principalmente sobre a influência da fertilização na composição química do óleo essencial.

A produção de biomassa, o rendimento e a composição química do óleo essencial de espécies aromáticas podem ser influenciados de acordo com o tipo de adubação, o ambiente e a época de cultivo (Sales *et al.*, 2009). Morais *et al.* (2012) notaram que a cama de aviário na dose de 5 kg m⁻² apresentou melhores resultados quanto à produção de folhas de *Ocimum selloi* quando comparada aos demais tratamentos orgânicos. Luz *et al.* (2010) observaram que as doses de 12 kg m⁻² de esterco bovino e 4,37 kg m⁻² de esterco de aves proporcionaram a maior produção de biomassa e o maior rendimento de óleo essencial das folhas de orégano (*Origanum vulgare*).

A adubação orgânica das plantas medicinais é parte essencial nos sistemas de cultivo orgânico, além de proporcionar melhoria da estrutura física do solo, aumento da retenção de água, redução das perdas por erosão, favorecimento do controle biológico e melhoria da capacidade tampão do solo. Adubos orgânicos possuem os macros e micronutrientes em

quantidades bem equilibradas, que as plantas absorvem conforme sua necessidade, em quantidade e qualidade (KIEHL, 2008).

Considerando a adubação química, um dos nutrientes essenciais para as plantas é o fósforo, cuja presença auxilia na definição da quantidade da biomassa produzida em diferentes solos, podendo ainda contribuir para o aumento da concentração de alcaloides e demais princípios ativos (BLANK *et al.*, 2005). O fósforo faz parte de compostos essenciais tanto para o metabolismo vegetal, que participam de fenômenos importantes como respiração e fotossíntese, quanto no estímulo do crescimento da planta, seja na formação das raízes, na formação e fecundação das flores, na fixação dos frutos e na formação das sementes (TAIZ e ZEIGER, 2010).

Com base na necessidade de estudos agronômicos, objetivou-se avaliar o efeito da adição ao solo de cama de frango e de fósforo sobre a produtividade de biomassa, o teor de macronutrientes e a composição química do óleo essencial das folhas de alfavaca azul africana.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no campo (22°11'43,7"S, 54°56'08,5"W e altitude de 430 m) e posteriormente no laboratório de plantas medicinais, em Dourados-MS, no período de abril de 2012 a fevereiro de 2013. O clima da região, segundo a classificação de Köppen (1948), é do tipo clima tropical com estação seca de inverno (Aw).

As precipitações totais, temperaturas máximas e mínimas e umidade relativa do ar do período de cultivo no campo estão apresentadas na Figura 1.

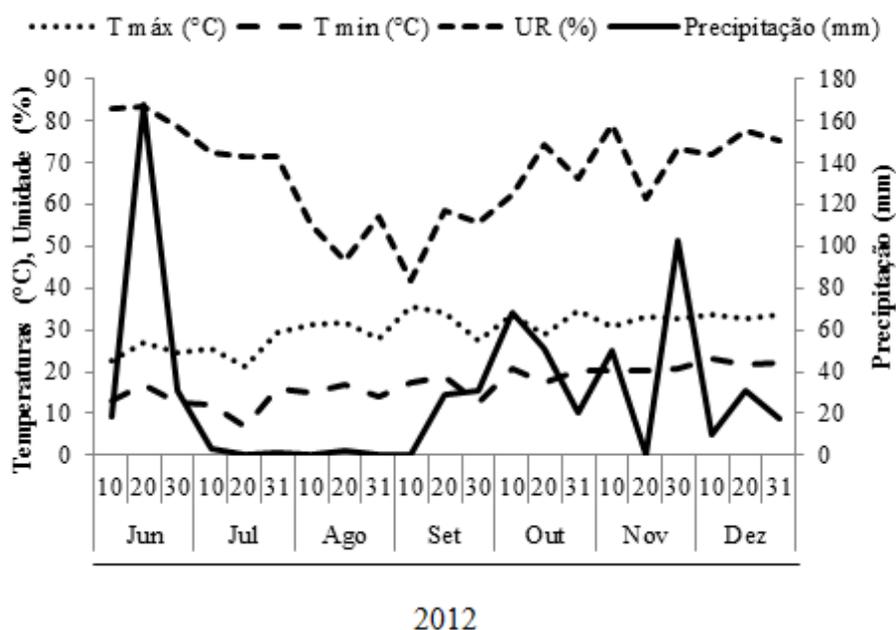


Figura 1 - Precipitação, temperaturas máxima e mínima e umidade relativa (UR) durante o ciclo de cultivo no campo da alfavaca azul africana.

O solo da área do experimento, originalmente sob vegetação de Cerrado, é de topografia plana e classificado como Latossolo Vermelho Distroférico, de textura muito argilosa, cujos atributos químicos antes da implantação do experimento indicaram: pH $\text{CaCl}_2 = 4,55$; pH $\text{H}_2\text{O} = 5,36$; P (mg dm^{-3}) = 7,06; K ($\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$) = 0,50; Al^{+3} ($\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$) = 0,80; Ca ($\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$) = 2,40; Mg ($\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$) = 1,20; H+Al ($\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$) = 2,69; SB ($\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$) = 4,10; T ($\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$) = 6,80; V (%) = 60,40.

Os atributos químicos do solo em função dos tratamentos foram analisados após o transplante e após a rebrota (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Atributos químicos das amostras do solo coletadas na área experimental após a incorporação da cama de frango e do fósforo.

Características ¹	Doses de cama de frango (t ha ⁻¹) sem e com fósforo (kg ha ⁻¹)									
	0		5		10		15		20	
	0	200	0	200	0	200	0	200	0	200
pH CaCl ₂	3,87	3,71	3,61	3,71	3,87	3,73	3,84	3,63	3,93	4,02
pH H ₂ O	5,34	5,15	5,30	5,23	5,29	5,14	5,38	5,29	5,30	5,28
Al ³⁺ (cmol _c dm ⁻³)	1,32	1,32	0,96	0,96	0,96	0,72	0,60	0,72	0,60	0,60
P (mg dm ⁻³)	7,94	10,67	14,86	30,18	32,00	42,11	21,06	25,80	33,91	36,83
K (cmol _c dm ⁻³)	0,38	0,38	0,42	0,46	0,62	0,51	0,49	0,50	0,55	0,62
Mg (cmol _c dm ⁻³)	0,83	0,84	0,87	0,85	1,26	0,94	1,05	0,97	1,14	1,20
Ca (cmol _c dm ⁻³)	1,50	1,54	1,53	1,75	2,17	1,98	1,84	1,90	2,12	2,16
H+Al (cmol _c dm ⁻³)	2,45	2,15	2,18	2,18	2,45	2,50	2,32	2,81	2,61	2,50
S.B. (cmol _c dm ⁻³)	2,70	2,77	2,83	3,07	4,05	3,43	3,39	3,37	3,81	3,98
T (cmol _c dm ⁻³)	5,15	4,92	5,00	5,24	6,49	5,93	5,71	6,18	6,42	6,48
Saturação de bases (%)	52,47	56,21	56,49	58,47	62,31	57,86	59,34	54,52	59,36	61,40

¹ Análises feitas no laboratório de solos da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) – UFGD

Tabela 2 - Atributos químicos das amostras do solo coletadas na área experimental após o segundo corte das plantas de alfavaca azul africana.

Características ¹	Doses de cama de frango (t ha ⁻¹) sem e com fósforo (kg ha ⁻¹)									
	0		5		10		15		20	
	0	200	0	200	0	200	0	200	0	200
pH CaCl ₂	4,18	4,13	4,22	4,18	4,19	4,16	4,35	4,31	4,26	4,22
pH H ₂ O	5,30	5,15	5,29	5,26	5,22	5,18	5,30	5,25	5,19	5,11
Al ³⁺ (cmol _c dm ⁻³)	1,59	1,59	1,26	1,41	1,44	1,53	1,02	1,11	1,35	1,35
P (mg dm ⁻³)	4,63	6,91	9,59	12,54	9,19	16,98	19,24	26,68	15,28	15,72
K (cmol _c dm ⁻³)	0,31	0,27	0,32	0,33	0,28	0,30	0,43	0,35	0,34	0,35
Mg (cmol _c dm ⁻³)	1,23	1,22	1,68	1,38	1,42	1,32	1,93	1,77	1,64	1,51
Ca (cmol _c dm ⁻³)	1,92	1,87	2,39	2,29	2,15	2,15	2,96	2,86	2,46	2,30
H+Al (cmol _c dm ⁻³)	3,01	3,09	3,08	3,28	3,05	3,08	3,21	3,02	3,40	3,16
S.B. (cmol _c dm ⁻³)	3,46	3,37	4,40	4,00	3,85	3,77	5,32	4,98	4,44	4,16
T (cmol _c dm ⁻³)	6,47	6,46	7,48	7,28	6,90	6,84	8,53	8,00	7,84	7,31
Saturação de bases (%)	53,22	51,97	58,70	54,90	55,29	54,66	61,68	61,41	56,45	56,92

¹ Análises feitas no laboratório de solos da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) – UFGD

2.1 Cultivo

Foram avaliadas cinco doses de cama de frango semidecomposta (0, 5, 10, 15 e 20 t ha⁻¹) sem e com a adição de fósforo (200 kg ha⁻¹), na forma de superfosfato triplo, incorporados ao solo. Os tratamentos foram arrançados em esquema fatorial 5 x 2, em delineamento experimental blocos casualizados, com quatro repetições. Foram feitos dois cortes das plantas, sendo o primeiro aos 70 dias após o transplante - DAT e o segundo (correspondente a rebrota) aos 140 DAT. Cada parcela teve área total de 3,0 m² (2,0 m de comprimento e 1,5 m de largura) e área útil de 2,0 m² (2,0 m de comprimento e 1,0 m de largura), com 16 plantas arrançadas em fileiras duplas, espaçadas entre elas de 0,25 m e entre fileiras, de 0,50 m.

Sementes de alfavaca azul africana foram obtidas por doação do banco de germoplasma da Embrapa - Cenargen, de Brasília-DF. A propagação foi por sementeira indireta em bandejas de poliestireno de 128 células preenchidas com substrato Bioplant®, colocadas sob ambiente protegido por sombrite 50%, em temperatura ambiente. O superfosfato triplo e a cama de frango foram distribuídos a lanço e incorporados ao solo dos canteiros com rotoencanteirador, a uma profundidade de 0-20 cm, um dia antes do transplante. Quando as plântulas atingiram cerca de 5 cm de altura foram transplantadas para os canteiros. Os tratamentos culturais na fase de campo compreenderam irrigações por aspersão, sempre que a umidade do solo estava em nível abaixo de 70% da capacidade de campo, o que foi medido com tensiômetro, e capinas manuais, quando observada a presença de plantas infestantes.

Durante o ciclo de cultivo no campo foram medidas as alturas e o índice SPAD (Soil Plant Analyzer Develop) de todas as plantas das parcelas, com intervalos de 10 dias. A altura de plantas foi medida desde os 20 aos 70 DAT e dos 90 aos 140 DAT. A altura foi medida com régua graduada em centímetros, colocada desde nível do solo até a inflexão da folha mais alta. O índice SPAD foi realizado dos 30 aos 70 DAT e dos 100 aos 140 DAT. O monitoramento do índice SPAD foi realizado utilizando-se um clorofilômetro portátil (Clorofilog CFL 1030 Falker). Aos 70 DAT foram colhidas todas as plantas das parcelas, cortando-se seus caules a 10 cm do nível do solo. Após a rebrota, foi feito novo corte (140 DAT). Por ocasião dos cortes, foram avaliadas as produtividades de massas frescas e secas das folhas, caules e inflorescências, além das determinações de áreas foliares utilizando o analisador de imagens Windias 3 (Windias, Delta-T Devices, Cambridge, UK).

Para obtenção da massa fresca, os componentes morfológicos das plantas foram separados e pesados em balança digital, com precisão de 0,1 g. Para massa seca, os materiais foram colocados em estufa de circulação forçada de ar, a $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, até massa constante e, posteriormente, pesada em balança digital. Em seguida, amostras de folhas de plantas de cada tratamento foram moídas e submetidas às análises químicas no Laboratório de Solos – FCA/UFGD, utilizando-se extratos obtidos através da digestão sulfúrica para o N e nítrico-perclórica para o P, K, Ca e Mg. Após a digestão, foram realizadas a determinação do N pelo método micro-Kjedhal, P por espectrofotometria (600J Femto), K por fotometria de chama (B462 Micronal) e Ca e Mg por espectrofotometria de absorção atômica (240FS Varian), segundo metodologia proposta por Malavolta *et al.* (1997).

2.2 Extração e composição do óleo

O óleo essencial foi extraído de 200 g das folhas frescas de plantas de cada tratamento, tanto no primeiro quanto no segundo corte. Devido à baixa produção de massa fresca de folhas no primeiro corte, as repetições foram agrupadas para realizar a extração do óleo essencial. A extração foi por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger, segundo metodologia proposta por Charles e Simon (1990), utilizando 3 L de água, por aproximadamente 4 horas. Ao final desta, fez-se a leitura do volume do óleo essencial para em seguida ser armazenado em micro tubo e estocado em freezer até o momento da análise da sua composição química. O teor do óleo essencial foi calculado pela fórmula: teor= volume (mL) / massa (g), e o rendimento do óleo essencial foi calculado pela fórmula: rendimento= teor x massa (kg ha^{-1}).

As análises do óleo essencial foram realizadas empregando cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG-DIC) e cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM). As análises por CG-EM foram realizadas empregando um cromatógrafo gasoso (GC-17A, Shimadzu, Kyoto, Japão) com detector de massas (QP 5050), usando uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (J & W, Folsom, California) 5% de fenil-dimetilpolisiloxano em sílica fundida capilar (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 μm de espessura). As condições de análise foram: gás carregador de hélio (99,999% e velocidade de fluxo de 1,0 mL min^{-1}). A injeção de 1 μL foi realizada com split (1:20). Programação de forno com temperatura inicial de 50°C à $3^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 250°C . Temperaturas

do injetor, detector e da linha de transferência foram de 280°C. Os parâmetros de varredura do EM incluíram voltagem de ionização de impacto de elétron de 70 eV, faixa de massa de 45 a 500 m/z e um intervalo de varredura de 0.5 s. O índice de retenção de cada pico foi calculado empregando uma mistura de alcanos lineares (C₈-C₃₀). A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros de massas obtidos com a biblioteca do equipamento e com a literatura (Adams, 2001).

Para a determinação da área relativa foi empregado um cromatógrafo a gás com detector de ionização em chama (Thermo Scientific – Focus GC, San Jose, CA, USA), com coluna capilar OV-5 (Ohio Valley Specialty Company, Marietta, OH, USA) 5% fenil dimetilpolisiloxano (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm de espessura). A injeção de 1 µL foi realizada com split (1:20). Programação de forno com temperatura inicial de 50°C à 3°C min⁻¹ até 250°C. Temperaturas do injetor e detector a 250°C, usando N₂ como gás carregador (99.999% e velocidade de fluxo de 1.0 mL min⁻¹). Os cromatogramas foram registrados pelo programa Chrom Quest 5.0 e analisados pelo programa Workstation Chrom Data Review.

2.3 Análises estatísticas

Os dados das características avaliadas nos diferentes cortes foram submetidos à análise de variância e quando houve significância pelo teste F, foram submetidos à análise de regressão, e quando não houve ajuste para os modelos testados foi realizado teste de Tukey, todos até 5% de probabilidade.

Os dados de teor e rendimento do óleo das folhas do segundo corte foram submetidos à análise de variância e quando houve significância pelo teste F, os dados em função de doses de cama de frango foram submetidos à análise de regressão, todos até 5% de probabilidade. A composição química e os teores de componentes do óleo essencial não foram submetidos à análise estatística.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A altura de plantas no primeiro corte foi influenciada significativamente pelo fósforo e dias após o transplante – DAT, e no segundo corte foi influenciada pela cama de frango e DAT. O índice SPAD no primeiro corte foi influenciado significativamente pelas doses de cama de frango e pela interação fósforo e DAT, e no segundo corte foi influenciado significativamente pelos DAT (Tabela 3).

Tabela 3 - Resumo das análises de variância de altura e índice SPAD de plantas de alfavaca azul africana em função da cama de frango, fósforo e dias após o transplante – DAT.

Fontes de variação	1º corte		2º corte	
	Altura	Índice SPAD	Altura	Índice SPAD
	Quadrado médio			
Bloco	-	-	-	-
Cama de frango	113,32	63,92*	549,70*	16,80
Fósforo	517,19*	204,43	2,53	1,55
Cama de frango x fósforo	26,09	13,06	25,28	16,52
Erro(a)	58,30	25,09	167,43	9,75
DAT	1395,01*	1902,91	4009,23*	40,87*
Cama de frango x DAT	5,13	9,36	13,59	8,71
Fósforo x DAT	5,69	42,87*	2,71	5,29
Cama de frango x fósforo x DAT	7,38	11,93	2,58	6,38
Resíduo	7,14	16,82	12,43	6,37
Coefficiente de variação (C. V. %)	20,13	9,04	8,46	5,44

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Maiores alturas de plantas no primeiro corte foram obtidas com o uso do fósforo (22,62 cm), que superou em 3,25 à das plantas cultivadas em solo sem adubação com fósforo (Figura 2). Isso ocorreu, provavelmente, porque a adubação com fósforo aumentou os teores desse elemento no solo (Tabela 1). O fósforo faz parte de compostos essenciais ao metabolismo vegetal, estimula o crescimento (TAIZ e ZEIGER, 2010) e favorece o desenvolvimento do sistema radicular, aumentando a absorção de água e nutrientes (VIEIRA *et al.*, 2012). Souza *et al.* (2011) observaram aumento na altura de plantas de alfavaca (*Ocimum gratissimum*) com o uso de 180 kg ha⁻¹ de P₂O₅.

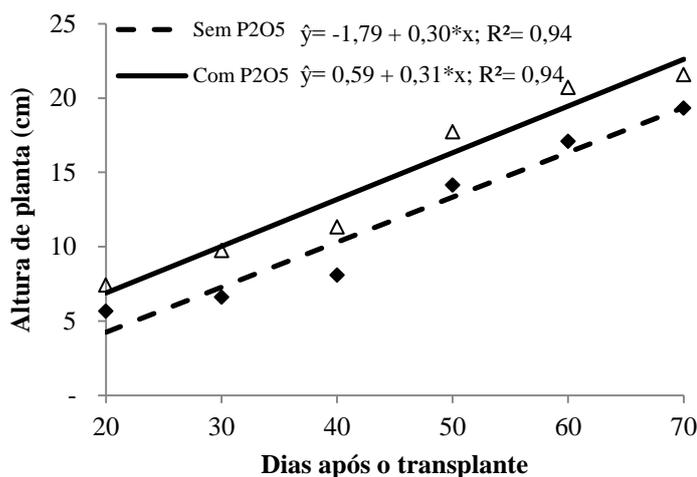


Figura 2 - Altura de plantas de alfavaca azul africana ao longo do ciclo de cultivo sem e com o uso de fósforo, no primeiro corte. Dados em função de cama de frango foram agrupados.

No segundo corte não houve ajuste matemático para caracterizar o crescimento em altura das plantas em função das doses de cama de frango, mas após a aplicação do teste de média, observou-se que a maior altura de planta foi obtida com o uso da cama de frango na dose de 15 t ha⁻¹, que superou em 9,37 cm à menor altura obtida pelas plantas cultivadas em solo sem cama de frango (Tabela 4). Essa resposta pode ser resultado da função da cama de frango como fonte de nutrientes, especialmente de nitrogênio e fósforo, e devido às suas características de manter o solo superficialmente mais úmido, facilitar a infiltração de água e conservar a bioestrutura do solo (KIEHL, 2010), permitindo melhor desenvolvimento e crescimento das plantas. Costa *et al.* (2008) observaram aumento na altura das plantas de *Ocimum selloi* com o incremento das doses de esterco bovino, sendo o valor máximo de 67,30 cm atingido com a aplicação de 8 kg m⁻².

Tabela 4 - Altura de plantas de alfavaca azul africana em função de cinco doses de cama de frango, no segundo corte. Os dados em função de fósforo foram agrupados.

Cama de frango (t ha ⁻¹)	Altura (cm)
0	36,98 b ¹
5	42,59 ab
10	40,63 ab
15	46,35 a
20	41,68 ab
C. V. (%)	5,44

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Considerando-se os cortes, a altura máxima (55,0 cm) alcançada aos 140 DAT (Figura 3), foi maior quando comparada ao primeiro corte (22,62 cm), o que corresponde a um crescimento de 58,9%, que ocorreu, provavelmente, porque as plantas já estavam com o sistema radicular desenvolvido e devem ter utilizado a maior parte dos fotossintatos produzidos para o desenvolvimento das partes aéreas. Ainda, dos 90 aos 140 DAT, que correspondeu aos meses de outubro a dezembro (Figura 1), houve precipitação mais constante quando comparada aos outros meses, e isso pode ter influenciado o crescimento das plantas.

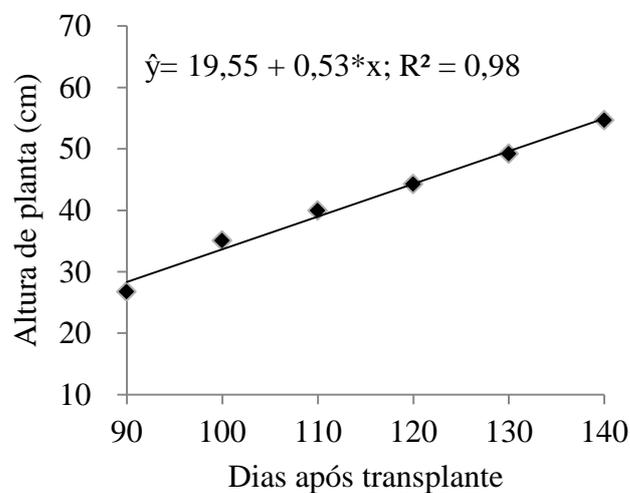


Figura 3 - Altura de plantas de alfavaca azul africana em função dos dias após o transplante, após a rebrota. Os dados em função de cama de frango e de fósforo foram agrupados.

Apesar das análises estatísticas terem detectado diferenças significativas nos valores dos índices SPAD em função das doses de cama de frango e da interação fósforo e DAT, não houve ajuste matemático para determinar a forma de crescimento e por isso as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Os maiores índices SPAD foram obtidos nas plantas cultivadas em solo com adição de 15 t ha⁻¹ de cama de frango (Tabela 5) e nas plantas com 40 DAT cultivadas no solo com adição de fósforo (Tabela 6). O índice SPAD é um importante método de avaliação de eficiência da adubação nitrogenada, uma vez que apresenta correlação com o teor de nitrogênio. Como a cama de frango é boa fonte de nutrientes, especialmente de nitrogênio (KIEHL, 2010) e a eficiência do processo de assimilação do nitrogênio é maior na folha (KERBAUY, 2004), esse aumento do índice SPAD na dose de 15 t ha⁻¹ de cama de frango ocorreu, possivelmente, devido a esse fator. Quanto à resposta ao fósforo, pode ser

porque ele participa ativamente em grande parte das reações bioquímicas da fotossíntese e as clorofilas estão diretamente associadas com o potencial da atividade fotossintética (TAIZ e ZEIGER, 2010).

Tabela 5 - Índice SPAD de plantas de alfavaca azul africana em função de cinco doses de cama de frango. Os dados em função de fósforo foram agrupados.

Cama de frango (t ha ⁻¹)	Índice SPAD
0	43,48 b ¹
5	45,30 ab
10	45,57 ab
15	47,03 a
20	45,46 ab
C. V. (%)	9,04

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 6 - Índice SPAD de plantas de alfavaca azul africana ao longo do ciclo de cultivo sem e com fósforo. Os dados em função de cama de frango foram agrupados.

Dias após transplante	Fósforo (200 kg ha ⁻¹)	
	Sem	Com
30	40,52 Ca ¹	42,98 BCa
40	54,49 Ab	59,95 Aa
50	44,86 Ba	45,64 BCa
60	39,47 Ca	40,42 Ca
70	42,44 BCa	42,90 BCa
C. V. (%)	9,04	

¹Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey na coluna e pelo teste F na linha a 5% de probabilidade.

No segundo corte o índice SPAD foi influenciado significativamente pelos DAT, porém não houve ajuste matemático para determinar a provável curva de crescimento. O maior índice SPAD foi obtido aos 140 DAT, que superou significativamente em 2,50 em relação ao obtido aos 130 DAT, que foi o de menor valor (Tabela 7).

Tabela 7 - Índice SPAD de plantas de alfavaca azul africana em função dos dias após o transplante. Dados em função de cama de frango e fósforo foram agrupados.

Dias após transplante (rebrotas)	Índice SPAD
100	45,56 bc ¹
110	46,53 abc
120	46,87 ab
130	45,17 c
140	47,67 a
C. V. (%)	5,44

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As características de produtividade avaliadas no primeiro e segundo cortes foram influenciadas significativamente pelo efeito isolado da cama de frango e dos cortes (Tabela 8).

Tabela 8 - Resumo das análises de variância de área foliar (AF), massa fresca (MFF) e seca da folha (MSF), massa fresca (MFC) e seca do caule (MSC) e massa fresca (MFI) e seca da inflorescência (MSI) de plantas de alfavaca azul africana cultivadas em solo adubado com cinco doses de cama de frango sem e com fósforo.

Fontes de variação	AF	MFF	MFC	MFI	MSF	MSC	MSI
	Quadrado médio						
Bloco	-	-	-	-	-	-	-
Cama de frango	6541316,0*	7634485,0*	6534270,0*	9840736,0*	203151,9*	388307,3*	957025,5*
Fósforo	1615824,0	1563843,0	680454,6	1060197,0	3599,9	40739,9	313835,5
Fósforo x cama de frango	609158,9	286878,8	194576,5	124865,2	3338,0	12165,3	17294,3
Erro(a)	688266,8	766324,8	840642,2	890266,1	24852,7	47487,4	118104,9
Cortes	114347300,0*	66599830,0*	98173060,0*	128707300,0*	2551269,0*	6573415,0*	19197050,0*
Cortes x cama de frango	813206,1	207768,1	953826,3	707600,3	23050,2	74980,7	128084,0
Cortes x fósforo	5591,7	43080,4	9104,0	4119,9	2498,6	460,5	36813,1
Cortes x fósforo x cama de frango	153845,8	375937,6	186541,4	1132547,0	14519,8	13534,4	225778,5
Resíduo	573227,5	445408,7	651777,6	815185,3	32186,2	41649,0	133826,9
C. V. (%)	38,07	27,19	42,11	34,91	44,17	44,85	45,60
Médias gerais	1988,3	2453,7	1916,9	2586,1	406,1	455,0	802,2

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

As maiores área foliar (Figura 4a), massa fresca e seca de folha (Figura 4b), massa fresca e seca de caule (Figura 4c) e massa fresca e seca de inflorescência (Figura 4d) foram obtidas quando se utilizaram 20 t ha⁻¹ de cama de frango. Essa maior produção em resposta ao fornecimento da cama de frango na maior dose pode ter ocorrido devido ao resíduo, ao ser incorporado, ter fornecido nutrientes para as plantas, proporcionado melhoria da estrutura física do solo e, conseqüentemente, ter aumentado a retenção de água, diminuído as perdas por erosão, favorecendo o aumento da população microbiana, além de melhorar a capacidade tampão do solo (KIEHL, 2008). Morais e Barbosa (2012) estudaram o efeito da adubação verde e de diferentes adubos orgânicos sobre a produtividade de plantas de *O. selloi* e concluíram que a cama de aviário (5 kg m⁻²) induziu melhores resultados quanto à produtividade de folhas das plantas, quando comparada aos demais tratamentos orgânicos.

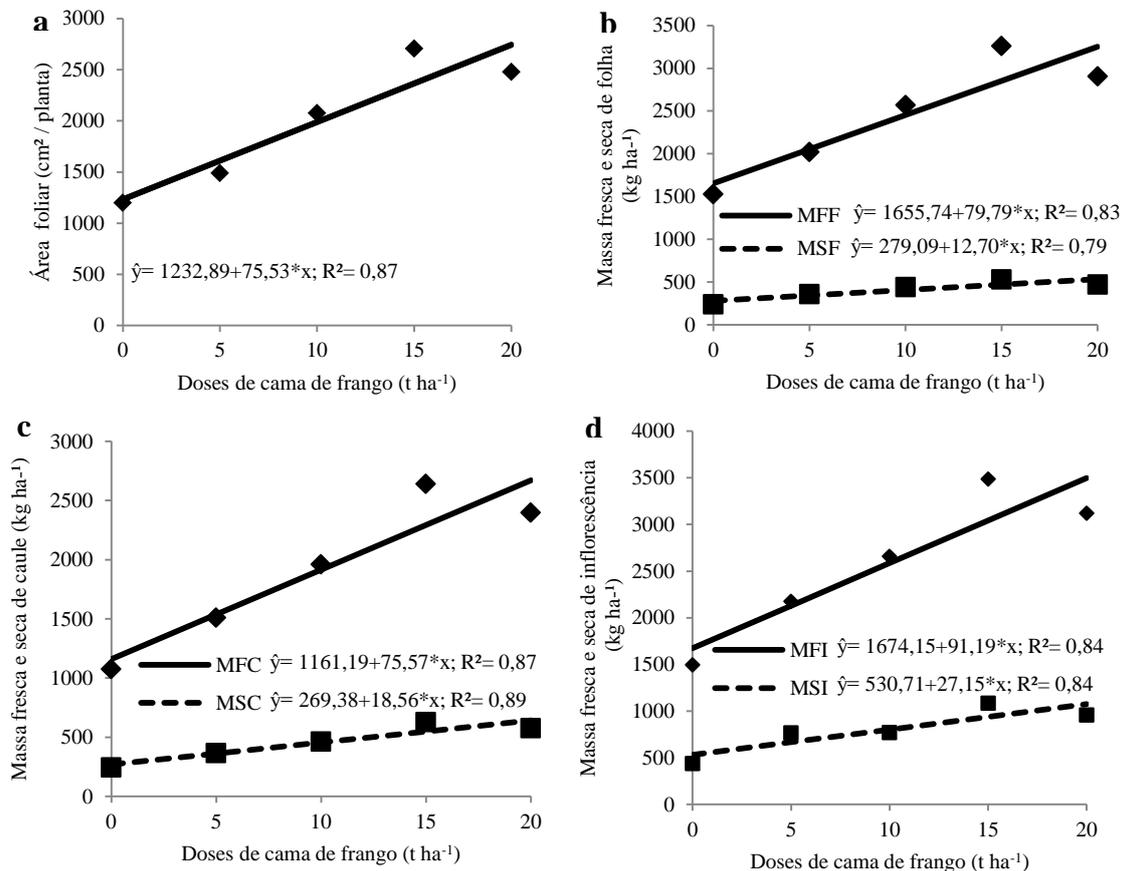


Figura 4 - Área foliar, massa fresca (MFF) e seca de folha (MSF), massa fresca (MFC) e seca de caule (MSC) e massa fresca (MFI) e seca de inflorescência (MSI) de plantas de alfavaca azul africana cultivadas em solo adubado com cinco doses de cama de frango. Os dados em função do fósforo e época foram agrupados.

Produtividades de massas frescas e secas de folhas, caules e inflorescências e a área foliar das plantas de alfavaca azul africana foram influenciadas significativamente pelas épocas de cortes, sendo os maiores valores obtidos no segundo corte (Tabela 9), o que ocorreu, provavelmente, porque a planta já estava com o sistema radicular desenvolvido, utilizando a maior parte dos fotossintatos produzidos para o desenvolvimento da parte aérea. Resultados diferentes foram obtidos por Biasi *et al.* (2009), que observaram redução no desenvolvimento das plantas de *Ocimum gratissimum* na segunda colheita, em relação à primeira, mas justificou que isso ocorreu devido à queda de temperatura no ciclo vegetativo até a segunda colheita.

Tabela 9 - Área foliar (AF), massa fresca (MFF) e seca de folha (MSF), massa fresca (MFC) e seca de caule (MSC) e massa fresca (MFI) e seca de inflorescência (MSI) de plantas de alfavaca azul africana colhidas antes e após a rebrota.

Cortes	AF	MFF	MFC	MFI	MSF	MSC	MSI
	(cm ² /planta)	(kg ha ⁻¹)					
Primeiro	793 b ¹	1541 b	809 b	1318 b	227 b	168 b	312 b
Segundo	3184 a	3366 a	3025 a	3854 a	585 a	742 a	1292 a
C. V. (%)	38,07	27,19	42,11	34,91	44,17	44,85	45,6

¹ Teste F a 5% de probabilidade.

Os teores de cálcio e magnésio foram influenciados significativamente pela interação cama de frango e cortes, enquanto os de potássio, nitrogênio e fósforo, pelos cortes (Tabela 10).

Tabela 10 - Resumo da análise de variância dos teores de potássio, nitrogênio, cálcio, magnésio e fósforo das folhas de plantas de alfavaca azul africana cultivadas em solo adubado com cinco doses de cama de frango sem e com fósforo.

Fontes de variação	Quadrado médio				
	Potássio	Nitrogênio	Cálcio	Magnésio	Fósforo
Bloco	-	-	-	-	-
Fósforo	0,04	1,44	9,73	0,45	0,02
Cama de frango	0,13	9,14	30,21	0,41	0,12
Cama de frango x fósforo	0,08	18,81	6,92	0,24	0,11
Erro (a)	0,16	8,98	29,48	0,34	0,19
Cortes	6,75*	2927,35*	31,40	1,24	2,88*
Fósforo x corte	0,10	0,33	0,29	0,11	0,01
Cama de frango x corte	0,03	9,63	75,56*	0,92*	0,09
Cama de frango x fósforo x corte	0,01	7,25	7,75	0,29	0,09
Resíduo	0,09	11,25	24,09	0,34	0,06
C. V. (%)	10,83	7,75	14,97	9,65	6,12

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Não houve ajuste matemático para caracterizar a forma de crescimento dos teores de cálcio e magnésio das folhas das plantas de alfavaca azul africana em função das doses de cama de frango e cortes. No primeiro corte, os maiores teores de cálcio (Tabela 11) e magnésio (Tabela 12) foram obtidos nas folhas de plantas cultivadas em solo com adição de 15 t ha⁻¹ de cama de frango e os menores valores foram encontrados nas folhas de plantas cultivadas em solo sem adição ou com adição de 5 t ha⁻¹ de cama de frango, respectivamente. Isso ocorreu, provavelmente, porque a cama de frango é um dos adubos orgânicos mais ricos em nutrientes, quando comparada aos esterco de bovinos, caprinos e suínos, e é comumente utilizada na agricultura como fonte de nutrientes para as plantas. Esse adubo geralmente apresenta altos níveis de fósforo, nitrogênio, potássio, cálcio e magnésio, o que o torna um fertilizante orgânico com potencial de uso em várias culturas (FARIDULLAH *et al.*, 2008; KIEHL, 2010).

Tabela 11 - Teor de cálcio nas folhas de plantas de alfavaca azul africana em função de cinco doses de cama de frango e cortes.

Cama de frango (t ha ⁻¹)	Teor de cálcio (g kg ⁻¹)	
	1º corte	2º corte
0	27,99 Bb ¹	33,69 Aa
5	31,00 ABa	35,25 Aa
10	33,89 ABa	32,42 Aa
15	37,01 Aa	32,15 Aa
20	30,91 ABa	33,57 Aa
C. V. (%)	14,97	

¹Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey na coluna e pelo teste F na linha a 5% de probabilidade.

Tabela 12 - Teor de magnésio nas folhas de plantas de alfavaca azul africana em função de cinco doses de cama de frango e cortes.

Cama de frango (t ha ⁻¹)	Teor de magnésio (g kg ⁻¹)	
	1º corte	2º corte
0	5,81 Aa ¹	5,70 Aa
5	5,78 Aa	6,23 Aa
10	6,29 Aa	5,97 Aa
15	6,60 Aa	5,71 Ab
20	6,15 Aa	5,79 Aa
C. V. (%)	9,65	

¹Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey na coluna e pelo teste F na linha a 5% de probabilidade.

Os menores teores de potássio, nitrogênio e fósforo observados nas folhas das plantas colhidas no segundo corte (Tabela 13) podem ter resultado do efeito de diluição com o aumento da massa; isso, porque o aumento relativo de massa seca pode ter sido superior à taxa de absorção relativa do nutriente (MALAVOLTA, 2006). Ainda, os teores de potássio e fósforo no solo até o primeiro corte (Tabela 1) estavam maiores quando comparados aos do segundo corte (Tabela 2) o que pode ter reduzido a absorção desses nutrientes. Quando a cama de frango, que é fonte de nutrientes, e o fósforo são aplicados no plantio, às concentrações desses nutrientes nos tecidos da planta aumentam porque a disponibilidade é elevada e a demanda pelo crescimento ainda é reduzida (KIEHL, 2010; TAIZ e ZEIGER, 2010).

Tabela 13 - Teores de potássio, nitrogênio e fósforo das folhas de plantas de alfavaca azul africana em função dos cortes.

Cortes	Potássio	Nitrogênio (g kg ⁻¹)	Fósforo
Primeiro	3,07 a ¹	49,35 a	4,02 a
Segundo (após a rebrota)	2,49 b	37,25 b	3,64 b
C. V. (%)	10,83	7,75	6,12

¹ Teste F a 5% de probabilidade.

O teor do óleo essencial das folhas da alfavaca azul africana não variou com o uso da cama de frango nem do fósforo. No primeiro corte, o teor foram em média 0,16%, e no segundo, 0,30%. Por outro lado, o rendimento, no segundo corte, foi maior (14,30 L ha⁻¹) com o uso de 20 t ha⁻¹ de cama-de-frango (Figura 5). Isso provavelmente ocorreu porque como a adubação com cama de frango foi importante para o desenvolvimento e produção das plantas, propiciando aumento de massa fresca e área foliar, também induziu maior rendimento do óleo essencial. Luz *et al.* (2009), estudando o teor e o rendimento de óleo essencial de dois acessos de manjerição (*Ocimum basilicum*) observaram que a cama de frango influenciou o teor e o rendimento. Para o acesso PI 197442-S3, a dose 4 kg m⁻² resultou em teor de 1,99% e rendimento de 23,29 L ha⁻¹ e para o NSL 6421-S3, a dose 2 kg m⁻² resultou em teor de 4,02% e rendimento de 10,61 L ha⁻¹. Costa *et al.* (2008) observaram que o maior rendimento (0,31g planta⁻¹) do óleo essencial de elixir paregórico (*O. selloi*) foi obtido com 4 kg m⁻² de esterco avícola.

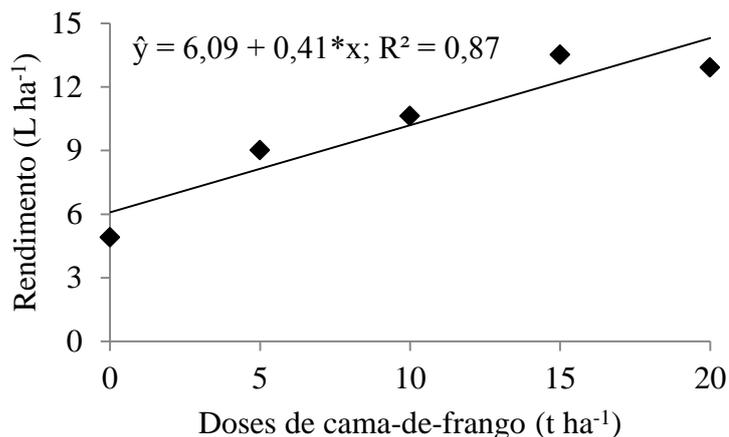


Figura 5 - Rendimento do óleo essencial de folhas de alfavaca azul africana em função de cinco doses de cama-de-frango no segundo corte. Os dados em função do fósforo foram agrupados.

A composição química do óleo essencial da alfavaca azul africana por CG-EM apresentou 45 compostos, destacando como majoritários a cânfora, limoneno e 1,8 cineol (Tabela 15). O teor da cânfora variou de 51,81%, nas folhas de plantas cultivadas em solo sem adição de cama de frango e fosforo a 64,69%, nas folhas das plantas cultivadas em solo com adição de 20 t ha⁻¹ de cama-de-frango e 200 kg ha⁻¹ de P₂O₅, resultando num aumento de 19,91% do teor de cânfora. O contrário ocorreu com o teor do 1,8 cineol, que variou de 20,13%, nas folhas de plantas cultivadas em solo sem adição de cama de frango e fosforo a 9,59%, nas folhas das plantas cultivadas em solo com adição de 20 t ha⁻¹ de cama-de-frango e 200 kg ha⁻¹ de P₂O₅, diminuindo 52,36%. Vários fatores podem afetar a composição química das plantas como, local de coleta, clima, nutrição, entre outros. Dentre esses fatores, a nutrição merece destaque, uma vez que a deficiência ou o excesso de nutrientes pode promover maior ou menor produção de princípios ativos. Ao avaliarem a composição química do óleo essencial dessa mesma espécie na Índia, Verma *et al.* (2011) também encontraram a cânfora como constituinte majoritário, com teor médio de 63,4%, comprovando que o local de cultivo e a nutrição das plantas influenciam o teor dos componentes do óleo essencial.

Tabela 15 - Composição química (%) do óleo essencial de folhas de plantas de alfavaca azul africana cultivadas em solo adubado com cama de frango sem e com fósforo. Primeiro corte.

Compostos Majoritários	IR ¹	Doses de cama-de-frango (t ha ⁻¹) sem e com fósforo (kg ha ⁻¹)									
		0		5		10		15		20	
		0	200	0	200	0	200	0	200	0	200
cânfora	1146	51,81	52,50	53,58	53,95	54,28	57,33	59,07	61,7	63,39	64,69
limoneno	1029	11,23	11,25	11,25	11,27	11,27	11,25	11,26	12,14	12,22	12,28
1,8 cineol	1031	20,13	20,33	19,43	19,43	19,36	16,51	14,95	12,57	10,87	9,59
y-cadineno	1514	2,94	3,22	3,22	3,15	3,07	3,05	3,02	2,68	2,64	2,64
canfeno	954	3,08	3,11	2,93	2,90	2,88	2,70	2,66	2,24	2,34	2,34
mirtenol	1197	1,48	1,28	1,21	1,32	1,30	1,32	1,29	1,30	1,30	1,31
α-pineno	932	1,48	1,40	1,40	1,40	1,27	1,22	1,20	1,24	1,14	1,14
flavesona	1548	1,27	1,30	1,30	1,22	1,22	1,20	1,21	1,20	1,20	1,20

Demais constituintes apresentaram valores inferiores a 1 %: santeno, isocitroneleno, β-citroneleno, 3-p-menteno, α-felandreno, 1,4 cineol, 2-acetil-tiazol, is-arbuscolono, cetona artemisia, di-hidromircenol, meta-cimeneno, terpinoleno, linalol, mircenol, 3-iso-tujanol, cis-verbenol, borneol, α-terpineol, verbenono, trans-piperitol, trans-carveol, carvona, α-ylangeno, bakerol, germacreno D, neril isobutanoato, acetato-vanilina, silfiperfol-5-en-3-ol, davanona D, tetradecanal, eremoligenol, 3-iso-tujopsanono, valerianol, cadeleno, sesquicineol-2-one, metil linoato, metil octadecanoato.

¹ Índice de Retenção.

4 CONCLUSÃO

Nas condições em que foi desenvolvido o trabalho, concluiu-se que a adição ao solo de 20 t ha⁻¹ de cama de frango induziu aumento da altura de planta, produção de massa fresca e seca, teor dos macronutrientes nas folhas e rendimento do óleo essencial de alfavaca azul africana. Associado a isso, houve ganho no teor de cânfora com o uso da cama de frango, no entanto, houve diminuição do teor do 1,8 cineol. Portanto, se o objetivo for produção de cânfora, recomenda-se o uso da cama de frango, e se o objetivo for a produção do 1,8 cineol, não usar a cama de frango. Após a rebrota, a produção de biomassa da alfavaca azul africana foi maior.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography /quadrupole mass spectroscopy**. Ed. Allured, 2001. 456 p.

BEKELE, A. J.; OBENG-OFORI, D.; HASSANALI, A. Evaluation of *Ocimum kenyense* (Ayobangira) as a source of repellents, toxicants and protectants in storage against three stored product insect pest. **Journal of Applied Entomology**, v. 121, p. 169–173, 2001.

BIASI, L. A.; MACHADO, E. M.; KOWALSKI, A. P. J.; SIGNOR, D.; ALVES, M. A.; LIMA, F. I.; DESCHAMPS, C.; CÔCCO, L. C.; SCHEER, A. P. Adubação orgânica na produção, rendimento e composição do óleo essencial da alfavaca-cravo quimiotipo eugenol. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n.1, p. 35-39, 2009.

BLANK, A. F.; SILVA, P. A.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; SILVA-MANN, R.; BARRETO, M. C. V. Influência da adubação orgânica e mineral no cultivo de manjerição cv. Genovese. **Revista Ciência Agronômica**, v. 36, n. 2, p. 175-180, 2005.

CHARLES, D. J.; SIMON, J. E. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of Basil. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v. 115, n.3, p. 458-462, 1990.

COSTA, L. C. B.; PINTO, J. E. B.; CASTRO, E. M.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CORRÊA, R. M.; REIS, E. S.; ALVES, P. B.; NICULAU, E. S. Tipos e doses de adubação orgânica no crescimento, no rendimento e na composição química do óleo essencial de elixir paregórico. **Ciência Rural**, v. 38, n.8, p. 2173-2180, 2008.

DOLLY, G.; NIDHI, S.; SAGAR, B. P. S.; SHWETA, R.; SHIKHA, A. *Ocimum kilimandscharicum* : a systematic review. **Journal of Drug Delivery & Therapeutics**, v. 2, n. 3, p. 45-52, 2012.

FARIDULLAH, M. I.; YAMAMOTO, S.; HONNA, T.; ENEJI, A. E. Characterization of trace elements in chicken and duck litter ash. **Waste Management**, v. 29, n. 1, p. 265-271, 2009.

JEMBERE, B.; HASSANALI, A. Products derived from the leaves of *Ocimum kilimandscharicum* (Labiatae) as post harvest protectant against the infestation of three major stored product insect pests. **Bulletin of Entomological Research**, v. 85, p. 361-367, 2001.

KASHYAP, C. P.; RANJEET, K.; VIKRANT, A.; VIPIN, K. Therapeutic potency of *Ocimum kilimandscharicum* Guerke. - A Review. **Global Journal of Pharmacology**, v. 5, n. 3, p. 191-200, 2011.

KERBAUY, G. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro, Guanabara. Koogan, 2004, 452 p.

KHARE, P. B. **Indian medicinal plants**. 1. ed. Berlim / Heidelberg, Springer Verlag, 2007.

KIEHL, E. J. **Novos fertilizantes orgânicos**. Piracicaba, SP. 2010, 248 p.

KIEHL, E. J. **Adubação orgânica - 500 perguntas e respostas**. 2. ed. Piracicaba: Degaspari, 2008. 227 p.

KÖPPEN, W. **Climatologia**: con un estudio de los climas de la tierra. México: Fondo de cultura Económica, 1948. 479 p.

KUMAR, A. A.; MANINDRA, M.; ZAFAR HAIDER, S.; AKASH, S. Essential oil composition and antimicrobial activity of three *ocimum* species from uttarakhand (Índia). **International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 3, p. 223, 2011.

KWEKA, E. J.; NKYA, H. M.; LYARUU, L.; KIMARO, E. E.; MWANG'ONDE, B. J.; MAHANDE, A. M. Efficacy of *Ocimum kilimandscharicum* plant extract safter four years of storage against *Anopheles gambiaess*. **Journal of Cell and Animal Biology**, v. 3, n. 10, p. 171-174, 2009.

LIMA, V. T.; PINTO, J. V. C.; ARAM, H. D. V. R.; GONÇALVES, W. V.; ALVES, J. M.; FERREIRA, F. O.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H. Substratos para propagação e desenvolvimento inicial de *Ocimum kilimandscharicum* Guerke.. In: VIII ENSub, Encontro Nacional de Substratos, 2012, Campo Grande-MS. **Anais VIII ENSub**, Campo Grande: UCDB, 2012.

LUZ, J. M. Q.; MORAIS, T. P. S.; BLANK, A. F.; SODRÉ, A. C. B.; OLIVEIRA, G. S. Teor, rendimento e composição química do óleo essencial de manjeriçãõ sob doses de cama de frango. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n.3, p. 349-353, 2009.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**: princípios e aplicações. Piracicaba: POTAFÓS. 1997. 319 p.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição de plantas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres. 2006. 638 p.

MORAIS, L. A. S.; BARBOSA, A. G. Influência da adubação verde e diferentes adubos orgânicos na produção de fitomassa aérea de atoveran (*Ocimum selloi* Benth.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. esp., p. 246-249, 2012.

NARWAL, S.; RANA, A. C.; TIWARI, V.; GANGWANI, S.; SHARMA, R. Review on chemical constituents & pharmacological action of *Ocimum kilimandscharicum*. **Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 4, p. 287-293, 2011.

SAHA, S.; DEY, T.; GHOSH, P. Micropropagation of *Ocimum kilimandscharicum* Guerke. (Labiatae). **Acta Biologica Cracoviensia Series Botânica**, v. 52, n. 2, p. 50-58, 2010.

SALES, J. F.; PINTO, J. E. B. P.; BOTREL, P. P.; SILVA, F. G.; CORREA, R. M.; CARVALHO, J. G. Acúmulo de massa, teor foliar de nutrientes e rendimento de óleo essencial de hortelã-do-campo (*Hyptis marruboides* epl.) cultivado sob adubação orgânica. **Bioscience Journal**, v. 25, n. 1, p. 60-68, 2009.

SOUZA, G. S.; SILVA, J. S.; SANTOS, A. R.; GOMES, D. G.; OLIVEIRA, U. C. Crescimento e produção de pigmentos fotossintéticos em alfavaca cultivada sob malhas coloridas e adubação fosfatada. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, v. 7, n. 13, p. 296-306, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 719 p.

TEWARI, D.; PANDEYB, H. K.; SAHA, A. N.; MEENAB, H. S.; MANCHANDAB, A. Pharmacognostical and biochemical investigation of *Ocimum kilimandscharicum* plants available in western Himalayan region. **Asian Journal of Plant Science and Research**, v. 2 n. 4, p. 446-451, 2012.

VERMA, R. S.; BISHT, P. S.; PADALIA, R. C.; SAIKIA, D.; CHAUHAN, A. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from two *Ocimum* spp grown in sub-tropical India during spring-summer cropping season. **Journal of Traditional Medicines**, v. 6, n. 5, p. 211-217, 2011.

VIEIRA, M. C.; RODRIGUES, W. B.; ZÁRATE, N. A. H.; RAMOS, D. D.; LUCIANO, A. T.; GONÇALVES, W. V.; CARNEVALI, T. O. Produção da fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] com cama-de-frango e fósforo incorporados ao solo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. esp., p. 235-241, 2012.

Capítulo 2

Composição química e atividade biológica do óleo essencial de *Ocimum kilimandscharicum* Guerke.

RESUMO

O óleo essencial das folhas de *Ocimum kilimandscharicum*, coletadas em Dourados-MS, foi investigado para avaliar a atividade antioxidante, antiproliferativa e anti-inflamatória. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação, e sua composição química foi determinada por CG-EM. Foi avaliada a atividade sequestradora de radicais livres do óleo essencial pelo método DPPH e a atividade antiproliferativa frente a dez linhagens de células tumorais humanas. Três parâmetros de resposta (IC_{50} , IC_{100} e LC_{50}) foram calculados para as linhagens de células testadas. A atividade anti-inflamatória foi avaliada por meio de pleurisia induzida por carragenina em camundongos. A composição química apresentou 45 compostos com predominância de monoterpenos como cânfora (51,81%), 1,8 cineol (20,13%) e limoneno (11,23%). O óleo essencial de *Ocimum kilimandscharicum* (OEOK) tem potente atividade “sequestradora” de radicais livres, avaliado pelo ensaio DPPH, com IC_{50} de $8,31 \mu\text{g mL}^{-1}$. A administração oral de OEOK (30 e de 100 mg kg^{-1}) foi capaz de reduzir significativamente a migração dos leucócitos totais em camundongos, com a inibição de $82 \pm 4\%$ (30 mg kg^{-1}) e de $95 \pm 4\%$ (100 mg kg^{-1}). Na triagem de citotoxicidade *in vitro* frente a dez linhagens de células de câncer humano, exibiu potente atividade contra linhagem de células de ovário, com $IC_{50} = 31,90 \mu\text{g mL}^{-1}$. Este trabalho descreve pela primeira vez a atividade antioxidante, antiproliferativa e anti-inflamatória do OEOK. O óleo essencial apresentou efeito antioxidante, antiproliferativo e anti-inflamatório e perfis de resposta diferentes de outros óleos coletados em diferentes localidades.

Palavras-chave: anti-inflamatória, antioxidante, antiproliferativa.

ABSTRACT

The essential oil from the leaves of *Ocimum kilimandscharicum*, collected in Dourados-MS, was investigated for anticancer, anti-inflammatory and antioxidant activity. The essential oil was extracted by hydrodistillation, and the chemical composition was determined by gas chromatography-mass spectrometry. The oil was evaluated for free radical-scavenging activity using the DPPH assay and was tested in an antiproliferation assay against ten human cancer cell lines. Three response parameters (GI_{50} , TGI, and LC_{50}) were calculated for the cell lines tested. The anti-inflammatory activity was evaluated using carrageenan-induced pleurisy in mice. The chemical compositions showed 45 components with a predominance of monoterpenes, such as camphor (51.81%), 1,8 cineole (20.13%) and limonene (11.23%). The essential oil from *O. kilimandscharicum* (EOOK) exhibited potent free radical-scavenging activity by the DPPH assay with a GI_{50} of $8.31 \mu\text{g mL}^{-1}$. The oral administration of EOOK (at 30 and 100 mg/kg) significantly inhibited the carrageenan (Cg) induced pleurisy, reducing the migration of total leukocytes in mice by $82 \pm 4\%$ (30 mg kg^{-1}) and $95 \pm 4\%$ (100 mg kg^{-1}). *In vitro* cytotoxicity screening against a human ovarian cancer cell line displayed high selectivity and potent anticancer activity with $GI_{50} = 31.90 \mu\text{g mL}^{-1}$. This work describes the anti-inflammatory, anticancer and antioxidant effects of EOOK for the first time. The essential oil exhibited marked anti-inflammatory, antioxidant and anticancer effects, and the response profiles differed from other oils collected in different locales.

Keywords: anti-inflammatory, antioxidant, antiproliferative.

1 INTRODUÇÃO

Os óleos voláteis de plantas são conhecidos e utilizados principalmente por suas propriedades biológicas, antibacterianas, antifúngicas e antioxidantes (DEANS; WATERMAN, 1993). Além disso, o grande interesse das indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos no uso de novos óleos voláteis e receptividade dos consumidores para os produtos de origem natural, tem transformado a sistemática de avaliação desses produtos vegetais em uma ferramenta amplamente utilizada na busca de novas formulações.

O gênero *Ocimum* (Lamiaceae) consiste em aproximadamente 150 espécies, com grande número de variedades ricas em óleo essencial, com teor variando entre 0,04-0,70% (SIMON, QUINN, e MURRAY, 1990). *Ocimum kilimandscharicum* Guerke., conhecida popularmente como “alfavaca azul africana” e “kilimanjaro” é um arbusto semi perene, nativa da África Oriental e amplamente utilizada na medicina tradicional para o tratamento de constipação, tosse, dores abdominais, sarampo e diarreia (KASHYAP *et al.*, 2011). O óleo essencial extraído das folhas possui ação comprovada como repelente (JEMBERE HASSANALI, 2001), antibacteriano (VERMA *et al.*, 2011) e antifúngico (NARWAL *et al.*, 2011). A ação repelente do óleo sobre adultos de *Sitophilus zeamais* e toxicidade frente a *Sitophilus zeamais* e *Rhizopertha dominica* foi descrita por Jembere e Hassanali (2001) e Bekele *et al.* (2001).

Dolly *et al.* 2012 citam que o principal componente do óleo essencial de *O. kilimandscharicum* é a cânfora. Kumar *et al.* (2011) avaliaram o óleo essencial das folhas de plantas da espécie coletadas na Índia e os principais constituintes encontrados foram cânfora (56,07%), limoneno (13,56%) e canfeno (7,32%). Kweka *et al.* 2009 avaliando o óleo essencial das folhas de plantas de *O. kilimandscharicum* coletadas em Naivasha, distrito de Kenya, relatam cânfora (70,4%), 1,8 cineol (7,2%) e limoneno (6,2%) como constituintes majoritários. Portanto, variação sazonal e local de coleta podem indicar diferentes composições químicas do óleo essencial.

Não há relatos de outros estudos com o óleo essencial de *O. kilimandscharicum*. Assim, nós reportamos a reinvestigação da composição química do óleo essencial das folhas de *O. kilimandscharicum* (OEOK), coletadas em Dourados-MS, e avaliação antiproliferativa, anti-inflamatória e sequestradora de radical livre.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Folhas de plantas de *O. kilimandscharicum* foram coletadas em Dourados-MS, Brasil, em área experimental (22°11'43,7"S, 54°56'08,5"W e altitude de 430m), em janeiro de 2013. A planta foi identificada e uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal da Grande Dourados-DDMS sob o número 5002.

2.2 Extração do óleo essencial

As folhas frescas (200 g) das plantas cultivadas em solo sem adubação foram submetidas à extração por hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger, segundo metodologia proposta por Charles e Simon (1990), utilizando 3 L de água, por aproximadamente 4 horas. O óleo essencial com odor característico foi obtido e armazenado em freezer a -6°C para posterior análise.

2.2 Análise do óleo essencial

As análises do óleo essencial de *O. kilimandscharicum* foram realizadas empregando cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG-DIC) e cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM). As análises por CG-EM foram realizadas empregando um cromatógrafo gasoso (GC-17A, Shimadzu, Kyoto, Japão) com detector de massas (QP 5050), usando uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (J & W, Folsom, California) 5% de fenil-dimetilpolisiloxano em sílica fundida capilar (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm de espessura). As condições de análise foram: gás carregador de hélio (99,999% e velocidade de fluxo de 1,0 mL min⁻¹). A injeção de 1 µL foi realizada com split (1:20). Programação de forno com temperatura inicial de 50°C à 3°C min⁻¹ até 250°C. Temperaturas do injetor, detector e da linha de transferência foram de 280°C. Os parâmetros de varredura do EM incluíram voltagem de ionização de impacto de elétron de 70

eV, faixa de massa de 45 a 500 m/z e um intervalo de varredura de 0.5 s. O índice de retenção de cada pico foi calculado empregando uma mistura de alcanos lineares (C₈-C₃₀). A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros de massas obtidos com a biblioteca do equipamento e com a literatura (Adams, 2001).

Para a determinação da área relativa foi empregado um cromatógrafo a gás com detector de ionização em chama (Thermo Scientific – Focus GC, San Jose, CA, USA), com coluna capilar OV-5 (Ohio Valley Specialty Company, Marietta, OH, USA) 5% fenil dimetilpolisiloxano (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm de espessura). A injeção de 1 µL foi realizada com split (1:20). Programação de forno com temperatura inicial de 50°C à 3°C min⁻¹ até 250°C. Temperaturas do injetor e detector a 250°C, usando N₂ como gás carregador (99.999% e velocidade de fluxo de 1.0 mL min⁻¹). Os cromatogramas foram registrados pelo programa Chrom Quest 5.0 e analisados pelo programa Workstation Chrom Data Review.

2.3 Animais

Foram utilizados cinco grupos de camundongos fêmeas Swiss (20-25 g, n= 7) do biotério da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Os animais foram mantidos sob um ciclo de 12h claro-escuro, com umidade (60-80%) e temperatura (22 ± 1°C) controladas. Os animais foram aclimatados para a sala de experimentação pelo menos 2h antes do teste e foram usados somente uma vez durante os experimentos. Todos os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com o Instituto Nacional de saúde dos EUA e foram aprovados pelo Comitê de ética para pesquisa em animais de laboratório da UFGD (Nbr. 023/2013).

2.4 Materiais e reagentes

1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH·), butil-hidroxitolueno (BHT), timol, carragenina (Cg), Tween 80, dexametasona, ácido tricloroacético e doxorrubicina foram obtidos da Sigma –Aldrich (EUA). Metanol, apirógeno, fosfato-salino, solução de Turck e dimetilsulfóxido foram obtidos da Vetec (RJ, Brasil).

2.5 Avaliação da atividade sequestradora de radical livre

A avaliação da atividade “sequestradora” de radicais livres foi determinada pelo método fotocolorimétrico *in vitro* do radical livre DPPH· (1,1-difenil-2-picril-hidrazil), utilizando como controle positivo o BHT (butil-hidróxi-tolueno) e o timol (BLOIS, 1958). Alíquotas de 10, 25, 50, 100, 250 e 500 µL das amostras do óleo essencial foram adicionadas a 2 mL da solução de DPPH· 0,004% e incubada na temperatura ambiente por 30 minutos. O método consistiu no monitoramento do consumo do radical livre DPPH· das amostras, através do decréscimo da medida de absorbância realizada em espectrofotômetro a 515 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A porcentagem de inibição (% I) foi calculada pela fórmula: $\% I = \frac{A_{DPPH} - (A_A - A_{DPPH})}{A_{DPPH}} \times 100$, onde A_{DPPH} é a absorbância máxima do DPPH e A_A é a absorbância da amostra em metanol. O IC₅₀ foi calculado a partir do gráfico de porcentagem de inibição versus concentração.

2.6 Avaliação da atividade antiproliferativa

A atividade antiproliferativa foi realizada *in vitro* em dez linhagens de células tumorais humanas: mama (MCF7), pulmão (NCI-460), ovário (OVCAR), próstata (PCO-3), cólon (HT29), rim (786-0), glaucoma (U251), ovário resistente (NCI/ADR), leucemia (K-562) e HaCaT, pelo método colorimétrico com sulforrodamina B (MONKS *et al.*, 1991). Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Os ensaios foram realizados em placa de 96 poços, usando cinco concentrações de OEOK (0, 0,25, 2,5, 25 e 250 mg mL⁻¹). A atividade foi obtida a partir da curva de concentração versus porcentagem de crescimento. O valor de IC₅₀ refere-se à concentração que produz 50% de redução do crescimento celular quando comparado ao controle não tratado. O IC₁₀₀ (concentração citostática) e o LC₅₀ (concentração citotóxica) referem-se às concentrações que inibem 100% do crescimento celular e para matar 50% das células, respectivamente.

2.7 Migração celular pleural

Três grupos de camundongos fêmeas Swiss foram tratados oralmente (1 hora antes da injeção intrapleural) com veículo e 30 e 100 mg kg⁻¹ de OEOK. Outro grupo de camundongos foi tratado por via subcutânea (0,5h antes da injeção intrapleural) com o anti-inflamatório dexametasona (dexta 1 mg kg⁻¹). A pleurisia foi induzida pela injeção intrapleural de 100 µL de carragenina 1% (VINEGAR *et al.*, 1973). Uma agulha adaptada foi inserida no lado direito da cavidade torácica dos animais para habilitar a administração intrapleural (i.p.) de carragenina. O grupo Naive recebeu igual volume (100 µL) de soro fisiológico estéril, de apirógeno. Após 4h, os animais foram mortos e a cavidade pleural foi lavada com 1 mL de tampão fosfato-salino (PBS). O volume de exsudato foi medido, e uma alíquota de 20 µL foi diluída em solução de Turck (1:20) e usada para determinar o número total de leucócitos em câmara de Neubauer. A contagem total de células foi realizada sob microscopia de luz e os resultados foram expressos como o número de células por mL de líquido pleural.

2.7. Análise estatística

Todos os dados são apresentados como média ± SEM. A diferença entre os grupos foi avaliada por análises de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas em $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por hidrodestilação, as folhas frescas de *O. kilimandscharicum* produziram 0,16% (v/m com base no peso do material vegetal fresco) de óleo essencial. A análise do óleo por CG-EM apresentou 45 compostos, com predominância de monoterpenos, destacando-se como majoritários a cânfora (51,81%), 1,8 cineol (20,13%) e o limoneno (11,23%) (Tabela 1). Outros compostos como α -pineno, canfeno, mirtenol, γ -cadineno e flavesona apresentaram concentrações na faixa de 1,20 a 3,22%. Os demais constituintes apresentaram valores inferiores a 1,0% (Tabela 1). Kweka *et al.* (2009), avaliando a composição química do OEOK em Naivasha, distrito de Kenya, também encontraram a cânfora como constituinte

majoritário, mas com teor de 70,4%. Ntezurubanza *et al.* (1984) relatam que o OEOK obtido em Kwanda apresentou 62% do 1,8 cineol, e como principais constituintes o limoneno e β -pineno. Essas variações nos teores dos compostos podem relacionar-se com as condições do ambiente a que a planta foi exposta, dentre elas a mineral, e as quantidades de água e de luz solar. Gobbo-Neto e Lopes (2007) afirmam que a sazonalidade, o ritmo circadiano, a temperatura e a luminosidade, bem como o estágio de desenvolvimento e a nutrição são fatores com maior probabilidade de interferência na composição química do óleo essencial.

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial de folhas de *O. kilimandscharicum*.

Compostos ^a	TR ^b	IR ^c	IL ^d	Teor (%)
santeno	5,73	889	889	0,01
isocitroneleno	6,77	922	924	0,05
α -pineno	7,13	932	939	1,48
β -citroneleno	7,57	945	950	0,02
canfeno	7,84	954	954	3,08
3-p-menteno	9,09	988	988	0,59
α -felandreno	9,66	1003	-	0,09
1,4 cineol	10,10	1013	1015	0,03
2-acetil-thiazol	10,32	1018	1018	0,04
limoneno	10,73	1029	1029	11,23
1,8 cineol	10,85	1031	1031	20,13
cis-arbuscolono	11,90	1054	1053	0,77
cetona artemísia	12,23	1062	1062	0,34
di-hidromircenol	12,75	1074	1074	0,41
meta-cimeneno	13,22	1085	1085	0,09
terpinoleno	13,47	1090	1089	0,04
linalol	13,82	1098	1097	0,05
mircenol	14,94	1122	1123	0,02
3-iso-tujanol	15,67	1138	1138	0,12
cis-verbenol	15,81	1141	1141	0,02
cânfora	15,91	1145	1146	51,81
borneol	17,15	1171	1169	0,30
α -terpineol	17,48	1178	1177	0,43
mirtenol	18,42	1197	1196	1,48
verbenono	18,77	1204	1205	0,02
trans-piperitol	18,94	1208	1208	0,01
trans-carveol	19,39	1217	1217	0,03
carvona	20,60	1243	1243	0,19
α -ylangeno	26,66	1375	1375	0,65

Continua...

				Continuação
bakerol	29,80	1446	1446	0,01
Germacreno D	31,52	1486	1485	0,08
neril isobutanoato	31,75	1491	1491	0,28
γ -cadineno	32,71	1514	1514	2,94
acetato-vanilina	33,25	1527	1527	0,78
flavesona	34,14	1548	1547	1,27
silfiperfol-5-en-3-ol	34,60	1560	1560	0,08
davanona D	35,83	1589	1588	0,26
tetradecanal	36,77	1613	1613	0,04
eremoligenol	37,45	1631	1631	0,23
3-iso-tujopsanono	37,97	1644	1643	0,07
valerianol	38,50	1658	1658	0,07
cadeleno	39,25	1677	1677	0,16
Sesquicineol-2-one	40,22	1702	1702	0,03
Metil linoato	54,00	2097	2096	0,13
Metil octadecanoato	54,85	2125	2125	0,04

^a Compostos listados em ordem de eluição em coluna de DB-5; ^b Tempo de retenção (min.); ^c Índice de retenção; ^d Índice da literatura.

O OEOK apresentou alta capacidade “sequestradora” de radicais livres com valor de IC_{50} de $8,21 \mu\text{g mL}^{-1}$, quando comparada com o antioxidante padrão BHT e timol (Tabela 2).

O efeito antioxidante observado no OEOK pode ser atribuído à elevada presença de monoterpenos, que possuem atividades provedoras de termotolerância, fotoproteção e antioxidante devido à capacidade de captarem radicais de oxigênio oriundos do processo fotossintético (PEÑUELAS e LLUSIÀ, 2002; PEÑUELAS e MUNNÉ-BOSCH, 2005). Pereira e Maia (2007) avaliaram o óleo essencial e o extrato das folhas de *Ocimum gratissimum* e observaram que tanto o óleo quanto o extrato apresentaram atividade antioxidante. Joshi (2013) avaliou o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* e *Ocimum sanctum* e observou que ambos possuem atividade antioxidante, porém o óleo essencial de *O. gratissimum* mostrou-se mais ativo em relação a *O. sanctum*.

Tabela 2 - Capacidade de sequestro do radical livre DPPH \cdot do óleo essencial de *O. kilimandscharicum*.

	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Intervalo de confiança
OEOK	8,21	7,14-13,68
BHT (Butil-hidroxi-tolueno)	16,20	14,80-20,30
Timol	32,00	30,20-33,14

Três parâmetros de resposta (IC₅₀, IC₁₀₀ e CL₅₀) foram calculados para as linhagens celulares e os resultados estão apresentados na tabela 3. Dentre as células testadas, verifica-se que o óleo essencial foi ativo frente à célula de ovário (OVCAR-3) com valor de IC₅₀ de 31,90 µg mL⁻¹ (Figura 1). Esse resultado pode ser atribuído à presença do limoneno, um dos constituintes majoritários do OEOK, pois Chander *et al.* (1994) citam que dentre os monoterpenos com propriedades antiproliferativas destaca-se o limoneno. Estudos têm demonstrado atividade antiproliferativa de espécies de *Ocimum*. Kathirvel *et al.* (2012) avaliaram o óleo essencial de *Ocimum basilicum* e observaram potente atividade antiproliferativa. Bhattacharyya *et al.* (2013) citam que o óleo essencial de *Ocimum sanctum* também possui atividade antiproliferativa. Ekunwe *et al.* (2013) avaliaram o extrato das folhas de *Ocimum gratissimum* e observaram atividade positiva frente a célula da próstata.

Tabela 3 - Valores de IC₅₀, IC₁₀₀ e CL₅₀ (µg mL⁻¹) do óleo essencial das folhas de *O. kilimandscharicum* e do controle doxorrubicina contra linhagens de células tumorais.

Linhagens de células	OEOK			Doxorrubicina		
	IC ₅₀	IC ₁₀₀	LC ₅₀	IC ₅₀	IC ₁₀₀	LC ₅₀
U251 (glaucoma)	-	-	-	0,03	2,68	-
PC-3 (próstata)	-	-	-	0,18	1,03	7,95
MCF7 (mama)	-	-	-	0,01	2,52	-
NCI/ADR-RES (ovário resistente)	-	-	-	0,20	22,42	-
786-0 (rim)	-	-	-	0,05	0,51	17,82
NCI-H460 (pulmão)	-	-	-	0,01	3,73	-
OVCAR-3 (ovário)	31,90	-	-	0,02	1,47	-
HT29 (côlon)	-	-	-	0,09	26,03	-
K-562 (leucemia)	-	-	-	0,03	2,60	20,00
HaCaT	> 100	-	-	0,01	0,78	-

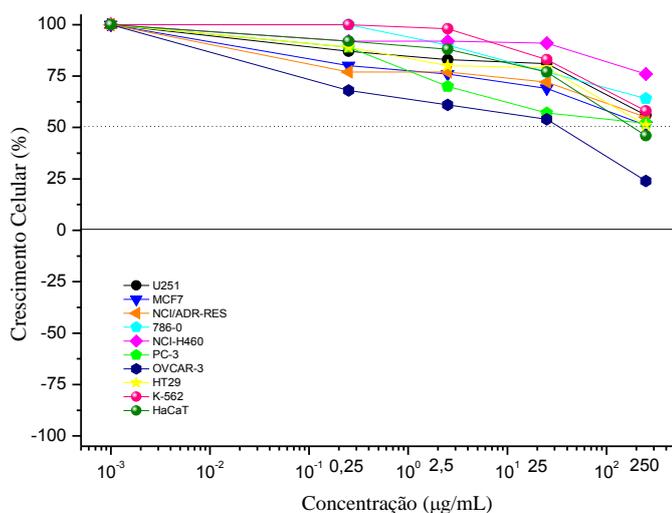


Figura 1 - Crescimento celular de dez linhagens de células tumorais humanas em resposta ao uso de cinco doses do óleo essencial de *Ocimum kilimandscharicum*.

O potencial anti-inflamatório do OEOK foi avaliado experimentalmente pela contagem de leucócitos totais induzidos por carragenina na cavidade pleural de camundongos. A Figura 2 demonstrou que a administração oral de OEOK diminuiu a migração celular, na dose de 30 e na dose de 100 mg kg⁻¹, com a inibição de 82 ± 4% para a dose de 30 mg kg⁻¹ e de 95 ± 4% para a dose de 100 mg kg⁻¹, quando comparado com o grupo controle, 4 horas após a injeção de carragenina. Os resultados são semelhantes ao do grupo controle positivo que induziu a inibição de 97 ± 2 %. Como um dos principais constituintes do OEOK é o 1,8 cineol, esse resultado pode ser atribuído a sua presença, pois estudos como o de Santos e Rao (2000) têm demonstrado que o 1,8 cineol possui atividade anti-inflamatória. Navin *et al.* (2013) avaliaram o óleo essencial de *Ocimum sanctum* e observaram atividade anti-inflamatória significativa.

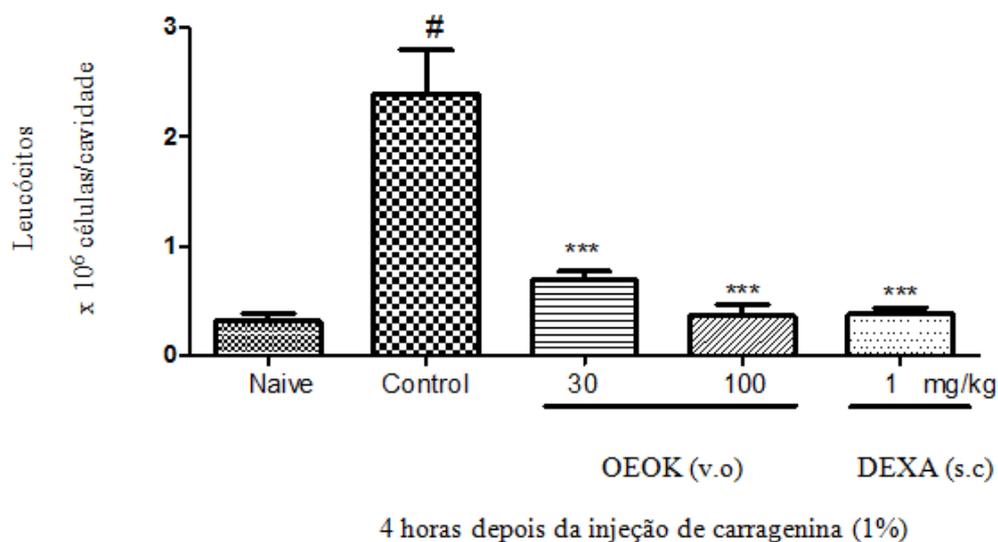


Figura 2 - Efeito do OEOK na contagem de leucócitos totais induzido por carragenina na cavidade pleural de camundongos. As barras expressam média \pm SEM de diferentes animais, comparado com veículo. * $P < 0,05$ * * * $P < 0,001$ (ANOVA), seguido de Student-Newman-Keuls.

4 CONCLUSÃO

Este é o primeiro relato na literatura do estudo da avaliação antiproliferativa, anti-inflamatória e antioxidante do óleo essencial de *Ocimum kilimandscharicum* – OEOK.

O óleo essencial das folhas de plantas de *O. kilimandscharicum* apresentou teor de 0,16% e como constituintes principais a cânfora, 1,8 cineol e limoneno. Além disso, o óleo essencial apresentou alta capacidade “sequestradora” de radicais livres, seletividade frente à célula de ovário (OVCAR-3) e redução da migração celular, na dose de 30 e 100 mg kg⁻¹, podendo ser associada com a presença de monoterpenos.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography /quadrupole mass spectroscopy**. Ed. Allured, 2001. 456 p.

BEKELE, A. J.; OBENG-OFORI, D.; HASSANALI, A. Evaluation of *Ocimum kenyense* (Ayobangira) as a source of repellents, toxicants and protectants in storage against three stored product insect pest. **Journal of Applied Entomology**, v. 121, p. 169-173, 2001.

BHATTACHARYYA, P.; BISHAYEE, A. *Ocimum sanctum* Linn. (Tulsi): an ethnomedicinal plant for the prevention and treatment of cancer. **Anticancer Drugs**, v. 24, n. 7, p. 659-66, 2013.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

CHANDER, S. K.; LANSDOWN, A. G. B.; LUQMANI, Y. A.; GOMM, J. J.; COOPE, R. C.; GOULD, M. N.; COOMBES, R. C. Effectiveness of combined limonene and 4-hydroxyandrostenedione in the treatment of NMU-induced rat mammary tumors. **British Journal of Cancer**, v. 69, p. 879-882, 1994.

CHARLES, D. J.; SIMON, J. E. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of Basil. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v. 115, n. 3, p. 458-462, 1990.

DOLLY, G.; NIDHI, S.; SAGAR, B. P. S.; SHWETA, R.; SHIKHA, A. *Ocimum kilimandscharicum*: a systematic review. **Journal of Drug Delivery & Therapeutics**, v. 2, n. 3, p. 45-52, 2012.

EKUNWE, S. I.; HALL, S. M.; LUO, X.; WANG, H.; BEGONIA, G. B. Fractionated *Ocimum gratissimum* leaf extract inhibit prostate cancer (PC3·AR) cells growth by reducing androgen receptor and survivin levels. **Journal of Health Care for the Poor and Underserved**, v. 24, n. 4, p. 61-69, 2013.

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

JEMBERE, B.; HASSANALI, A. Products derived from the leaves of *Ocimum kilimandscharicum* (Labiatae) as post harvest protectant against the infestation of three major stored product insect pests. **Bulletin of Entomological Research**, v. 85, p. 361-367, 2001.

JOSHI, R. K. Chemical composition, in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum*, *O. sanctum* and their major constituents. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, n. 4, p. 457-462, 2013.

KASHYAP, C. P.; RANJEET, K.; VIKRANT, A.; VIPIN, K. Therapeutic potency of *Ocimum kilimandscharicum* Guerke. - A Review. **Global Journal of Pharmacology**, v. 5, n. 3, p. 191-200, 2011.

KATHIRVEL, P.; RAVI, S. Chemical composition of the essential oil from basil (*Ocimum basilicum* Linn.) and its in vitro cytotoxicity against HeLa and HEP-2 human cancer cell lines and NIH 3T3 mouse embryonic fibroblasts. **Natural Product Research**, v. 26, n. 12, p. 1112-1118, 2012.

KUMAR, A. A.; MANINDRA, M.; ZAFAR HAIDER, S.; AKASH, S. Essential oil composition and antimicrobial activity of three ocimum species from uttarakhand (India). **International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 3, p. 223, 2011.

KWEKA, E. J.; NKYA, H. M.; LYARUU, L.; KIMARO, E. E.; MWANG'ONDE, B. J.; MAHANDE, A. M. Efficacy of *Ocimum kilimandscharicum* plant extract safter four years of storage against *Anopheles gambiaess*, **Journal of Cell and Animal Biology**, v. 3, n. 10, p. 171-174, 2009.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLET, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; RAY, G. M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of National Cancer Institute**, v. 83, n. 11, p. 757-766, 1991.

NARWAL, S.; RANA, A. C.; TIWARI, V.; GANGWANI, S.; SHARMA, R. Review on chemical constituents & pharmacological action of *Ocimum kilimandscharicum*, **Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 4, p. 287-293, 2011.

NAVIN, M.; AJAY, L.; NASEEM, S.; SEEMA, S.; SURENDRA, S.; ISHA, N. Preliminary ex-vivo and an animal model evaluation of *Ocimum sanctum's* essential oil extract for its antibacterial and anti-inflammatory properties. **Oral Health and Dental Management**, v. 12, n. 3, p. 174-179, 2013.

NTEZURUBANZA, L.; SCHEFFER, J. J. C.; LOOMAN, A.; SVENDSEN, A. B. Composition of essential oil of *Ocimum kilimandscharicum* Grown in Rwanda. **Planta Medica**, v. 50, n. 5, p. 385-388, 1984.

PEÑUELAS, J.; LLUSIÀ, J. Linking photorespiration, monoterpenes and herbivore tolerance in *Quercus*. **New Phytologist**, v. 155, p. 227-238, 2002.

PEÑUELAS, J.; MUNNÉ-BOSCH, S. Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. **Trends in Plant Science**, v. 10, p. 166-169, 2005.

PEREIRA, C. A. M.; MAIA, J. F. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 624-632, 2007.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 240-244, 2000.

SIMON, J.E.; QUINN, J.; MURRAY, R. G. Basil: a source of essential oils. In: JANICK, J.; SIMON, J. E. (eds.), **Advances in new crops**. Timber Press, Portland, Oregon. p. 484-489, 1990.

VERMA, R. S.; BISHT, P. S.; PADALIA, R. C.; SAIKIA, D.; CHAUHAN, A. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from two *Ocimum* spp grown in subtropical India during spring-summer cropping season. **Journal of Traditional Medicines**, v. 6, n. 5, p. 211-217, 2011.

VINEGAR, R.; TRAU, J. F.; SELPH, J. L. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in the rat. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 143, n. 3, p. 711-714, 1973.

CONCLUSÃO GERAL

Nas condições em que foi desenvolvido o trabalho, concluiu-se que a adição ao solo de cama de frango aumentou a altura de planta, a produção de massa fresca e seca, o teor dos macronutrientes nas folhas e o rendimento do óleo essencial de alfavaca azul africana. Associado a isso, houve ganho no teor de cânfora com o uso da cama de frango, no entanto, houve diminuição do teor do 1,8 cineol. Portanto, se o objetivo for produção de cânfora, recomenda-se o uso da cama de frango, e se o objetivo for a produção do 1,8 cineol, não usar a cama de frango. Após a rebrota, a produção de biomassa da alfavaca azul africana foi maior.

O óleo essencial das folhas de plantas de *O. kilimandscharicum* apresentou teor de 0,16% e como constituintes principais a cânfora, 1,8 cineol e limoneno. Além disso, o óleo essencial apresentou alta capacidade “sequestradora” de radicais livres, seletividade frente à célula de ovário (OVCAR-3) e redução da migração celular, na dose de 30 e 100 mg kg⁻¹, podendo ser associada com a presença de monoterpenos.

REFERÊNCIAS

ADELODUN, V. O.; ELUSIYAN, C. A.; OLORUNMOLA, F. O.; ADEWOYIN, F. B.; OMISORE, N. O.; ADEPITI, A. O.; AGBEDAHUNSI, J. M.; ADEWUNMI, C. O. Evaluation of antitrypanosomal and anti-inflammatory activities of selected nigerian medicinal plants in mice. **African Journal of Traditional Complementary Alternative Medicines**, v. 10, n. 6, p. 469-476, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 156 p.

BEKELE, A. J.; OBENG-OFORI, D.; HASSANALI, A. Evaluation of *Ocimum kenyense* (Ayobangira) as a source of repellents, toxicants and protectants in storage against three stored product insect pest. **Journal of Applied Entomology**, v. 121, p. 169–173, 2001.

EKUNWE, S. I.; HALL, S. M.; LUO, X.; WANG, H.; BEGONIA, G. B. Fractionated *Ocimum gratissimum* leaf extract inhibit prostate cancer (PC3-AR) cells growth by reducing androgen receptor and survivin levels. **Journal of Health Care for the Poor and Underserved**, v. 24, n. 4, p. 61-69, 2013.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1829-1829, 2010.

GOVIN, E. S.; LÓPEZ, I. M. L.; HERNÁNDEZ, L. F.; FERRADA, C. A. R. Estúdio farmacognóstico de *Ocimum basilicum*, (albahaca blanca). **Revista Cubana de Farmácia**, v. 34, n. 3, p. 187-195, 2000.

JOSHI, R. K. Chemical composition, in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum*, *O. sanctum* and their major constituents. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, n. 4, p. 457-462, 2013.

KALLUF, L. J. H. **Fitoterapia funcional: dos princípios ativos à prescrição de fitoterápicos**. 1.ed. São Paulo: VP Editora, 2008. 304p.

NAVIN, M.; AJAY, L.; NASEEM, S.; SEEMA, S.; SURENDRA, S.; ISHA, N. Preliminary ex-vivo and an animal model evaluation of *Ocimum sanctum's* essential oil extract for its antibacterial and anti- inflammatory properties. **Oral Health and Dental Management**, v. 12, n. 3, p. 174-179, 2013.

SIMON, J.E.; QUINN, J.; MURRAY, R. G. Basil: a source of essential oils. In: JANICK, J.; SIMON, J. E. (eds.), **Advances in new crops**. Timber Press, Portland, Oregon. p. 484-489, 1990.

ANEXO A – Normas da revista Phytomedicine

PHYTOMEDICINE

International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology.

DESCRIPTION. Phytomedicine is primarily a therapy-oriented Journal. Phytomedicine publishes innovative studies on efficacy, safety, quality and mechanisms of action of specified plant extracts, phytopharmaceuticals and their isolated constituents. This includes clinical, pharmacological, pharmacokinetic, and toxicological studies of specified herbal medicinal products, herbal preparations and purified compounds which have a defined and consistent quality assuring reproducible pharmacological activity. Phytomedicine was founded in 1994 to focus and stimulate research in this particular field and to set internationally accepted scientific standards for pharmacological studies, proof of clinical efficacy and safety of phytomedicines. The main aims of Phytomedicine are associated with the integration of phytopreparations into conventional/official medicine. The journal covers the following sections: Clinical pharmacology and toxicology (randomized, placebo controlled, double blind, and observational open label studies) Behavioural, mental, affective, and stress-associated disorders Age-associated disorders Neuropharmacology Endocrine pharmacology Metabolic syndrome and obesity Cancer Immunopharmacology, inflammation Infectious diseases Pulmonary, gastrointestinal, cardiovascular and urogenital diseases Systems biology Safety assessment, pre-clinical toxicology, interaction with drugs and adverse events of herbal preparations Pharmacokinetic of natural compounds Standardization of herbal preparations Legislation of botanicals Invited reviews The directions of Phytomedicine are known to provide profound scientific background in Herbal Medicinal Products, their reproducible Quality and evidence based therapeutic efficacy. Since then quality criteria and standardization methods were defined and the European Medical Agency has elaborated numerous guidelines for the conduction of clinical studies and preparation of Herbal Medicinal Products. In total 107 ESCOP monographs have been produced and submitted to EMA. Many new analytical methods and instruments were implemented both for analysis and standardization of herbal Substances, herbal preparations and their bioassays and tremendous work has been carried out to remain aligned with these intentions during the last 18 years. Nowadays important topics remain to be approached, such as harmonization of the regulatory frameworks in Europe, America, Asia and Australia or the legislation of various "botanicals", where strict differentiation of requirements for health claims of herbal medicinal product, dietary supplements and nutraceuticals are required.

GUIDE FOR AUTHORS

PREPARATION

Types of manuscript

Original papers

Articles should not exceed 12–15 typewritten pages or up to 5,000 words, including references, tables and figures. Previously reported methods should be referenced only. The number of references should not exceed 30 (except for review articles or reports on microarray data). Short communications should be condensed to 4–8 typewritten pages or not more than 2,500 words including references and a maximum of two illustrations.

Review articles

Review articles will only be by invitation. Review articles can provide concise and critical updates on a subject of current interest. Herbal drug-monographs are only acceptable if they contain the newest pharmacological and toxicological issues and an outlook on future directions. Prof. Hildebert Wagner Award The "Prof. Hildebert Wagner Award" was created to honor the outstanding efforts of Prof. Wagner for the journal *Phytomedicine*. This award will be granted to a graduate student or young post-doctoral researcher who is the first author of a paper reviewed by the Editors of *Phytomedicine* to be the best one in the Journal during the previous calendar year. The prize will be sponsored by Elsevier with EUR 500 for the awardee and a certificate for every Co-Author. Additionally an official notice will be published on the journal homepage of *Phytomedicine* (<http://www.elsevier.com/locate/phymed>), on which the article will be available free of charge for one year. The reviewing editors for the first contribution to be awarded in *Phytomedicine* will be Prof. Hildebert Wagner himself, Prof. Alexander Panossian, and Prof. Susana Zacchino. To qualify, nominees must be younger than 35 years and an outstanding contribution to the field must be provided. Nominations can be made by first authors (resp. corresponding authors). Nominations for the first "Prof. Hildebert Wagner Award" in 2015 can be done until June 30, 2015. The announcement of the winner will be by end of October 2015. Please choose Award-Article from the drop-down menu below, if you want your article to be considered for the Award.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Example: Anti-stress effects of 20(S)-protopanaxadiol and 20(S)-protopanaxatriol in immobilized mice

Hyun A Oha, Dae-Eung Kimb, Hyuck Jai Choic, Nam Jae Kimc, and Dong-Hyun Kimac,* a Department of Life and Nanopharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Kyung Hee University, 26, Kyungheedaero, Dongdaemun-ku, Seoul 130-701, Republic of Korea b Sempio Foods Company, 183, Osongsaengmyung-4ro, Cheongwongun, Chungcheongbukdo 363-954, Republic of Korea c East-West Medical Research Institute, Kyung Hee University Medical Center, 23, Kyungheedaero, Dongdaemun-ku, Seoul 130-872, Republic of Korea * Corresponding author Dong-Hyun Kim, Department of Life and Nanopharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Kyung Hee University, 26, Kyungheedaero, Dongdaemun-ku, Seoul 130-701, Republic of Korea Tel.: +82 2 961 0374; fax: +82 2 957 5030. E-mail address: dhkim@khu.ac.kr (D.H. Kim). **The phone, fax and email address of the corresponding author should be placed on the title page.

Abstract

A concise and factual abstract is required. Abstracts should summarize the contents of the article in 350 words or less. The abstract should be structured in the following format: Background: In one or two sentences, summarize the scientific body of knowledge surrounding your study and how this led to your investigation.

Hypothesis/Purpose: State the theory(ies) that you are attempting to prove or disprove by your study or the purpose if no hypothesis exists.

Study Design: Identify the overall design of your study. **Methods:** Succinctly summarize the overall methods you used in your investigation. For clinical studies include the study population, type of intervention, method of data collection, and length of the study.

Results: Report the most important results of your study. Only include positive results that are statistically significant, or important negative results that are supported by adequate power. For clinical studies report actual data, not just P values.

Conclusion: State the answer to your original question or hypothesis. Summarize the most important conclusions that can be directly drawn from your study.

Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. **Image size:** please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h \times w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. **Preferred file types:** TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). **Be sparing with abbreviations:** only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

A section of abbreviations should precede the manuscript. Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article. See "Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals" (1991) *New England Journal of Medicine* 324:424–428.

Pagination and line numbers

Only manuscripts with page and line numbers will be reviewed.

Introduction

Provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. State the objectives of the work. No results of the study should be described in this section.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described. Plant names and parts used In the Materials and Methods section there must be a separate heading for describing the herbal substance used. That includes official Latin binomial name and the author, local name, English name and plant part(s) used. In case of collection in the wild or cultivation, a voucher specimen must be deposited for possible future comparison. In the text it should be stated that the plant name has been checked with www.theplantlist.org mentioning the data of accessing that website. In case of commercially procured material the source, batch number, and quality control data should be mentioned. All Scientific plant names must be written in italic through the whole manuscript! Study medication, herbal extracts A separate heading for describing herbal medicinal products or herbal preparations in accordance to EMA guidelines is required and must be declared (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC_500003272.pdf). In particular, preparation of herbal extracts must be clearly and comprehensively described with respect to the drug extract ratio, type and concentration of extraction solvent, etc. They must be sufficiently characterized (TLC and/HPLC fingerprint should be provided, e.g. <http://www.springer.com/biomed/pharmaceutical+science/book/978-3-7091-0762-1>) and specified for the content of marker compounds to ensure consistent quality and reproducible pharmacological activity. The choice of marker must be justified. The analytical methods have to be validated and briefly described, providing the most important information necessary to obtain reproducible results. Herbal substances used in investigations stated as derived from cultivated plants or from their natural origin must be deposited.

For description of study medications used in clinical studies see CONSORT extension for herbal medicinal products. http://www.consort-statement.org/Media/Default/Downloads/Extensions/CONSORT_Extension_for_Herbal_Interventions.pdf

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003370.pdf.

Chemical compounds

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). The PubChem CIDs can be found via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>. Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the

Gene nomenclature

Authors should use approved nomenclature for gene symbols. Please consult the appropriate nomenclature data bases for correct gene names and symbols. "Entrez Gene" is a useful resource. Approved human gene symbols are provided by HUGO Gene Nomenclature committee (HGNC): <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature> Approved Mouse symbols are provided by The Jackson Laboratory: <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen> Approved C. elegans symbols are provided by Caenorhabditis Genetics Center: <http://www.cbs.unmn.edu/CGC/Nomenclature/nomenclature.htm> For approved S. cerevisiae and S. pombe symbols see <http://yeastgenome.org/help/yeastGeneNomenclature.shtml> and http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe/SP_Name_FAQ.shtml, respectively.

Statistical analysis

Statistical hypothesis and methods should be described in detail. Actual P values should be used unless less than 0.001. Reporting of 95% confidence intervals is encouraged. The choice of appropriate parametric or nonparametric tools has to be justified. Refer to B.S. Evererett. Statistical Methods for Medica Investigations, Oxford University Press, New York, 1989.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are

correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
 2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
 3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.
- Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication: Wagner., H., Ulrich-Merzenich, G., 2009. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* 16, 97–110.

Reference to conference proceedings: Argyropoulos D, Kudadam J, Müller J, 2009. Color degradation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) as affected by the drying process. In: 5th International Technical Symposium on Food Processing, Monitoring Technology in Bioprocesses and Food Quality Management, Potsdam, Germany, August 31– September 2, pp. 730–736. Willcox, M.L., Graz, B., Falquet, J., Diakite, C., Giani, S., Diallo, D., 2011. A "reverse pharmacology" approach for developing an anti-malarial phytomedicine. *Malaria J.* 10 (Suppl. 1), S8.

Reference to a book: Cramer, J.A., Spilker, B., 1998. *Quality of Life and Pharmacoeconomics. An Introduction*. LippincottRaven, Philadelphia.

Reference to a chapter in an edited book: Cragg, G.M., Boyd, M., 1996. Drug discovery and development at the National Cancer Institute: the role of natural products of plant origin. In: Balick, M.J., Elisabetsky, E., Laird, S.A. (Eds.), *Medicinal Plant Resources of the Tropical Forest*. Columbia University Press, New York, pp. 101–136. Journal abbreviations source: Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in

their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Data deposit and linking

Elsevier encourages authors to deposit raw data sets underpinning their research publication in data repositories, and to enable interlinking of articles and data. Please visit <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information on depositing and linking your data with a supported data repository.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item. Ensure that the following items are present: One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers All necessary files have been uploaded, and contain:
- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes) Further considerations
- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked' • References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet) Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white
- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes. For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059> When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 9 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please

check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/. You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

ANEXO B – Aceite do artigo referente ao capítulo 2 da dissertação

The screenshot shows an Outlook.com web interface. The browser address bar displays the URL: <https://bay169.mail.live.com/?tid=cvvr43ExwjSS8gKz5-03iUDQ2&fid=flsearch&srch=1&skws=anelise&sdr=4&satt=0>. The Outlook.com header includes navigation options: Novo, Responder, Excluir, Arquivar, Lixo Eletrônico, Limpar, Mover para, and Categorias. The user's name, Vânia Tomazelli de Lima, is visible in the top right.

The email content is as follows:

Your Submission

Em Quarta-feira, 2 de Julho de 2014 7:27, Phytomedicine <h.wagner@cup.uni-muenchen.de> escreveu:

Ms. Ref. No.: PHYMED-D-14-00307R1
Title: Chemical composition and free radical-scavenging, anticancer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Ocimum kilimandscharicum*
Phytomedicine

Dear Dr. Formagio,

I am pleased to inform you that your paper "Chemical composition and free radical-scavenging, anticancer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Ocimum kilimandscharicum*" has been accepted for publication in Phytomedicine.

Thank you for submitting your work to Phytomedicine.

Yours sincerely,

Silvia Baecher
Editorial Office
Phytomedicine

On the right side of the email, there is a partial view of a "Obrigado" (Thank you) message with the text: "Os seus comentários ajudam-nos a melhorar a experiência de utilização dos nossos serviços."