

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MESTRADO PROFISSIONAL  
EM BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA  
FACULDADE DE FARMÁCIA**

**VINÍCIUS MOSER GOULART**

**Efeito da hipergravidade simulada sobre a  
germinação, o crescimento e a produção de  
óleo essencial de manjeriço (*Ocimum  
basilicum* L.)**

**Porto Alegre  
Janeiro/2015**

VINÍCIUS MOSER GOULART

**Efeito da hipergravidade simulada sobre a  
germinação, o crescimento e a produção de  
óleo essencial de manjeriço (*Ocimum  
basilicum* L.)**

Dissertação de Mestrado realizado no Programa de Pós – graduação em Mestrado Profissional em Biotecnologia Farmacêutica (MPBF), para aquisição do grau de Mestre. Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Marlise Araújo dos Santos, Ph.D.

**Porto Alegre  
Janeiro/2015**

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer a todos que tornaram possível a realização deste trabalho, em especial a minha orientadora e professora Marlise Araújo dos Santos, a todos os colegas do Laboratório de Farmácia Aeroespacial Joan Vernickos e também ao Laboratório IDEIA por ter me cedido espaço para realizar parte do meu experimento, ao laboratório LOPE, em especial ao professor Eduardo Cassel e a colega Aline Machado Lucas por me auxiliarem e ajudarem na parte de engenharia química. Finalmente agradeço à minha família por todo o apoio, moral e financeiro, que me deram durante estes dois anos de estudo e em toda a minha vida.

## RESUMO

O mercado internacional de óleos essenciais movimenta anualmente 1,8 bilhões de dólares e a participação brasileira nesse mercado é de apenas 0,1%. A grande biodiversidade brasileira, ainda pouco explorada em relação à composição química de sua flora, coloca o Brasil numa situação muito promissora para aumentar sua participação futura no mercado de óleos essenciais. O manjeriçõ (*Ocimum basilicum* L.) é uma planta aromática largamente cultivada, devido à suas propriedades medicinais. A importância dessa espécie está na arquitetura da planta, na coloração e na morfologia das folhas e flores, além da composição química de seus óleos essenciais, originando aromas específicos e tendo utilização variada na gastronomia, perfumaria e indústria farmacêutica. Nesse trabalho, foram realizados dois experimentos, com o objetivo de estudar a germinação por hipergravidade simulada e o cultivo a céu aberto para avaliar o crescimento do manjeriçõ, rendimento e a composição do óleo essencial. A extração do óleo essencial foi feita por arraste a vapor em aparelho Clevenger. A avaliação quantitativa e qualitativa dos compostos foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a um detector de massas (CG/MS). As médias de germinação deste trabalho foram de 81% a 87%. Após essa etapa, as sementes sob efeito de hipergravidade simulada foram cultivadas a céu aberto e, depois de 90 dias, foram coletadas folhas frescas de manjeriçõ para obter óleos essenciais. O rendimento total de óleo foi de 0,2 mL a 0,3 mL e de óleo essencial de 0,3% a 0,4%. O composto majoritário e predominante em nossas pesquisas foi o eugenol, variando entre 46% a 62%, e o segundo maior composto foi o linalol, que ficou entre 22% a 28%. Pesquisas nessa área são essenciais para entender o real impacto da hipergravidade simulada no manjeriçõ, seu efeito na auxina e sua expressão gênica.

**Palavra chave:** *Ocimum basilicum*, hipergravidade, germinação, extração de óleo essencial.

## ABSTRACT

The international market for essential oils has an annual turnover of 1.8 billion dollars, yet the Brazilian participation in this market is only 0.1%. The vast biodiversity found in Brazil, although still little explored in relation to the chemical composition of its flora, places the country in a very promising position in terms of increasing its future participation in the essential oils market. Basil (*Ocimum basilicum* L.) is a widely cultivated aromatic plant due to its medicinal properties. The importance of this species lies in the plant architecture, coloration and morphology of its leaves and flowers, in addition to the chemical composition of its essential oils, giving specific aromas and having various uses in the culinary, perfume and pharmaceuticals industries. In this study, two experiments were performed with the aim of studying germination in simulated hypergravity and open-air cultivation, to evaluate the growth of the basil, its yield and essential oil composition. The extraction of the essential oils was carried out by steam distillation in a Clevenger apparatus. Quantitative and qualitative evaluation of the compounds was performed by gas chromatography coupled to a mass spectrometer detector (GC/MS). The mean values for germination under the effect of hypergravity simulation in protocols 1, 2 and 3 ranged from 81% to 87%. After this stage, the seeds exposed to simulated hypergravity were cultivated in the open-air and the fresh basil leaves were collected after 90 days to obtain the essential oils. The overall yield of oil was 0.2mL to 0.3mL and the essential oil was 0.3% to 0.4%. The largest and most predominant compound in this research was eugenol, ranging from 46% to 62%, with the second largest being linalool, which ranged from 22% to 28%. Further research in this area is essential to understand the real impact of simulated hypergravity on basil, and its effect on auxins and gene expression.

**Keywords:** *Ocimum basilicum*, hypergravity, germination, essential oil extraction

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Nomenclatura de terpenos de acordo com a cadeia carbônica e unidades de isopreno.....	<b>16</b>
---	-----------

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – *Ocimum basilicum* L. cv. Italiano folha grande.....13
- Figura 2** – Estrutura de alguns terpenos típicos: (A1, A2, A3, A4) Monoterpenos; (B1, B2) Sesquiterpenos; (C1) Diterpeno; (D1) Triterpeno; (E1) Tetraterpeno.....17
- Figura 3** – Estruturas dos principais componentes monoterpenos presentes no óleo essencial de *Ocimum basilicum* L .....19

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>11</b>
2.1. Ação da hipergravidade sobre metabolismo e germinação.....	11
2.2. Aspecto da cultura de manjeriço ( <i>Ocimum basilicum</i> L.).....	12
2.3. Metabólitos primários e secundários.....	15
2.4. Óleos essenciais.....	15
2.5. Óleo essencial de manjeriço.....	18
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
3.1 Objetivos específicos.....	21
<b>4. DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>22</b>
<b>5. ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>27</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>47</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>53</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O mercado de óleos essenciais é próspero para países que dispõem de uma grande biodiversidade e possuem condições de agregar valor às suas matérias-primas, transformando-as em produtos beneficiados. Se o país garantir o desenvolvimento tecnológico nessa área, poderá deixar a posição de fornecedor de matéria-prima e passar a posição de produtor de extratos vegetais, óleos essenciais e princípios ativos de alto valor agregado. Dados da consultoria *Global Industry Analysts* indicam que o mercado de produtos que utilizam plantas como matéria-prima (incluindo, além de medicamentos, alimentos e cosméticos) deve atingir US\$ 93 bilhões em 2014. Atualmente, perto de 80% da população europeia consome de alguma forma medicamento fitoterápico (sendo o consumo da Europa responsável por aproximadamente 50% do mercado total do produto), assim como o fazem mais de 40% dos habitantes dos países asiáticos (1).

O mercado internacional de óleos essenciais movimenta anualmente 1,8 bilhões de dólares, e a participação brasileira nesse mercado é de apenas 0,1%, concentrados basicamente sobre óleos cítricos, os quais são subprodutos da produção de concentrados de laranja. A grande biodiversidade brasileira, ainda pouco explorada em relação à composição química de sua flora, coloca o Brasil numa situação muito promissora para aumentar a sua participação futura no mercado de óleos essenciais. Diversas espécies nativas brasileiras, ainda que em pequena escala, já estão sendo exploradas para a extração de óleos essenciais, os quais são utilizados pela indústria de perfumaria e cosméticos, para a fabricação de produtos para o mercado interno e externo (2). Os óleos essenciais, além da indústria de perfumaria e cosméticos, possuem uma vasta

possibilidade de utilizações, como na de produtos de higiene e limpeza, de alimentos, de tintas e também na agricultura, para o controle biológico de doenças e pragas (3).

A continentalidade do Brasil dificulta a definição do comportamento das espécies aromáticas, que, devido à grande diversidade climática e de solo possibilitam diferenças no desenvolvimento e na produção de metabólitos secundários. Por outro lado, permite que sejam localizados microclimas favoráveis para o cultivo das mais diversas espécies, desde as de clima tropical até as de clima temperado (2). A pesquisa com plantas aromáticas no Brasil poderá resultar na promoção de novas culturas para a agricultura, possibilitando aos agricultores uma nova fonte de renda e diversificação da atividade agrícola.

O manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) é muito utilizado no Brasil e muito valorizado, sendo objeto de estudo em vários países. Suas folhas aromáticas são usadas frescas ou secas como essência na culinária, em produtos de confeitaria e bebidas. Tradicionalmente, estas plantas têm sido empregadas na medicina como carminativo, estimulante e também devido às suas propriedades antiespasmódicas. O seu óleo essencial é principalmente usado nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de perfumaria, e o seu principal quimiotipo no óleo essencial, o linalol, possui propriedades terapêuticas antifúngicas, antimicrobianas e antiparasitárias (2,3). Dada a elevada importância de produtos de origem vegetal para estas indústrias, a busca de novas tecnologias como a hipergravidade simulada, que visem uma alternativa para o aumento da produção tanto de material vegetal como de metabólitos secundários é de extrema importância. Assim, esta passa a ser objeto de investigação pela comunidade científica internacional como uma alternativa para ampliar a produção de óleos essenciais e quimiotipos com atividades terapêuticas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão serão apresentados os principais aspectos/conceitos envolvidos no desenvolvimento desta dissertação.

### 2.1 Ação da Hipergravidade sobre Metabolismo e Germinação

A gravidade teve um efeito profundo sobre o desenvolvimento da vida na Terra ao longo de milhões de anos e moldou a anatomia e fisiologia dos seres vivos, incluindo os seres humanos, animais e vegetais. A força gravitacional da Terra sempre foi um fator importante na regulação do crescimento e desenvolvimento de plantas. Forças gravitacionais maiores que +1G têm sido úteis para estudos do papel da gravidade no crescimento de vegetais. Há duas hipóteses que tentam explicar o mecanismo de percepção da gravidade nas plantas. A hipótese *starch-statolith* afirma que densos corpos de amido chamados amiloplastos, encontrados nas células da raiz, agem como um sensor de gravidade das plantas (4,5). Já a hipótese *protoplast pressure*, através de observações de plantas alteradas geneticamente contendo poucos amiloplastos, defende que a percepção da gravidade é causada pelo peso de todo o conteúdo das células da raiz (6,7). Contudo, até hoje a maioria dos dados a respeito da influência da gravidade na fisiologia e morfologia dos vegetais têm sido obtida quando o vegetal é submetido às mudanças na orientação do vetor gravitacional (4,6). Para esta finalidade as experiências no espaço fornecem condições de microgravidade, enquanto aquelas que usam técnicas de centrifugação fornecem condições de hipergravidade (6,8,9). Experimentos em hipergravidade podem revelar os mecanismos envolvidos em animais ou plantas, tecidos ou células em resposta às mudanças gravitacionais. No Centro de Microgravidade FENG/PUCRS, onde se localiza o Laboratório de Farmácia

Aeroespacial *Joan Vernikos*, foram realizados experimentos em simulação de hipergravidade. Estudos realizados por Santos et al.(10), demonstraram números aumentados na germinação de sementes de cenoura, *Daucus carota* L. sob a influência de hipergravidade, enquanto Russomano et al.(11), encontraram resultados semelhantes com a rúcula, *Eruca sativa* Mill. Segundo os autores, este aumento significativo no número de sementes germinadas, quando comparado com o grupo controle, é provavelmente, devido ao efeito da hipergravidade sobre auxinas (hormônios vegetais). Secções histológicas em cotilédones de rúcula submetidas à simulação de hipergravidade demonstraram uma distribuição diferenciada no óleo essencial, quando comparado com o grupo controle (11).

## **2.2 Aspectos da Cultura de Manjeriço (*Ocimum Basilicum* L.)**

O manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), também conhecido como alfavaca, basilicão, manjeriço italiano, *sweet basil*, pertence à família Lamiaceae (12). É uma planta herbácea e aromática com a altura entre 45 a 90 cm, originário da Ásia tropical trazido pela colonização italiana ao Brasil (13). As folhas de manjeriço são membranáceas, com margens onduladas e nervuras salientes e possuem de 2,5 cm a 8 cm de comprimento; apresenta caule ramificado com flores as quais dependendo da variedade são de coloração branca, rósea, branco amarelada, avermelhada, lilás ou levemente púrpura, reunidas em racemos terminais curtos (14). Os frutos do tipo aquênio estão dispostos em numerosas inflorescências (espigas ou racemos) típicas do gênero. Multiplica-se por sementes e estacas (15).

Quanto ao seu desenvolvimento, na literatura considera como anual; porém a espécie pode ser tanto perene quanto anual dependendo do clima, da variedade ou cultivar (12). No Brasil, grande parte da produção de plantas medicinais não é tecnificada e sim obtida por extrativismo através da agricultura familiar por pequenos

produtores rurais principalmente da região nordeste (13). Assim, o manejo da cultura é conduzido de forma pouco padronizada, o que pode afetar a produção de biomassa, qualidade e quantidade do óleo essencial. A época de colheita, o horário e o modo de secagem do material vegetal também podem ter influencia sobre a composição e o teor do óleo (14).

**Figura 1:** *Ocimum basilicum* L. cv. Italiano folha grande.



**Fonte:** Autor, 2014.

Com relação ao clima, as plantas de manjericão se adaptam melhor a climas amenos ou quentes e úmidos não tolerando temperaturas frias e geadas. Quando as plantas dessa espécie estão submetidas a baixas temperaturas durante o ciclo, há o comprometimento de seu desenvolvimento e redução do teor de óleo essencial, principalmente se essas condições climáticas coincidirem com a época de corte (12). Recomenda-se para espécies medicinais a aplicação de adubação orgânica, pois além de favorecer a resistência das plantas a pragas e doenças, não compromete a produção de massa fresca e de princípios ativos (13). Também são consideradas como espécie

intermediária com relação ao fotoperíodo. A propagação pode ser feita por estaquia ou sementes (14).

*O. basilicum* apresenta 50% do seu florescimento na 12<sup>a</sup> semana, com pico na 14<sup>a</sup> semana após o plantio (mais de 80% das flores totalmente abertas). Após a 16<sup>a</sup> semana ocorre uma queda significativa das flores e folhas o que corresponderá ao início da fase de frutificação (12). Recomenda-se para a extração do óleo essencial que a colheita seja feita no início da floração, quando a produção de óleo essencial é máxima; entretanto, o maior acúmulo de óleo essencial na espécie *O. basilicum* encontra-se na fase de pleno florescimento (13). Vale ressaltar que muitos fatores, como a variedade, condição climática e época de colheita podem interagir, sendo que a variação desses fatores altera o rendimento, a composição química e a qualidade sensorial do manjericão italiano. Assim, o cultivo do manjericão é normalmente feito em ambiente protegido, minimizando, desta forma, as interferências causadas por esses fatores. Como resultado, pode-se obter um maior crescimento das plantas, precocidade de colheita, além da redução de um possível estresse fisiológico (13,14).

O manjericão é muito cultivado em quase todo o Brasil em hortas domésticas para uso condimentar e medicinal, sendo inclusive comercializado na forma fresca em feiras e supermercados. Existe também cultivares de folhagem arroxeadas para uso ornamental (3). Por ser uma planta aromática e restaurativa ela é usada na medicina popular para aliviar espasmos, baixar a febre e calafrios, melhorar a digestão, controlar níveis de açúcar no sangue, ajuda a diminuir a pressão sanguínea além de ser efetiva contra infecções bacterianas e parasitárias. Possuindo propriedade bactericida e ação fungicida, as folhas do manjericão são utilizadas em prurido da pele, picada de insetos e em outras afecções de pele (16).

### **2.3 Metabólitos Primários e Secundários**

Todos os organismos vivos possuem caminhos metabólicos pelos quais sintetizam e utilizam espécies químicas essenciais, como açúcares, aminoácidos, nucleotídeos (DNA, RNA) e polímeros dele derivados, como polissacarídeos, proteínas, ácidos graxos, lipídeos, e etc. Esses compostos são metabólitos primários, essenciais para a sobrevivência dos organismos. O processo sintético primário é a fotossíntese, por meio da qual as plantas verdes utilizam a energia solar para a produção de compostos orgânicos. Um grupo reduzido de metabólitos primários serve como precursores para a síntese de outros compostos em reações catalisadas enzimaticamente. Estes compostos são chamados de metabólitos secundários (15). Há três principais precursores de metabólitos secundários: ácido chiquímico ou ácido acético, precursor de compostos fenólicos que formam vários compostos aromáticos; acetato precursor de isopreno ou terpeno, ácidos graxos, polifenóis, prostaglandinas, etc.; e os aminoácidos, precursor de alcalóides. O metabolismo do acetato (acetil-CoA) via rota do ácido mevalônico gera o diversificado grupo de metabólitos secundários, que representam a segunda classe de maior constituinte ativo, na qual se encontram os óleos essenciais(17).

### **2.4 Óleos Essenciais**

Os óleos essenciais são constituídos por uma mistura complexa, muito variada. Nessa mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações e normalmente os componentes que se encontram em maiores concentrações, ou seja, os compostos majoritários nos óleos essenciais são importantes na caracterização das propriedades do óleo essencial e na identificação dos quimiotipos. Componentes minoritários também apresentam significativa importância, sendo normalmente produzidos no final das rotas metabólicas (15,17). São constituídos de substâncias voláteis contidos em vários órgãos das plantas, na maioria das vezes, por moléculas de

natureza terpênica que também podem ser chamados de óleos etéreos. Os óleos essenciais possuem aroma que caracteriza certas plantas e são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos (15,17,18). De acordo com a família a que pertencem, as espécies de plantas acumulam esses elementos voláteis em órgãos anatômicos específicos (folhas, flores, frutos, raiz). Os terpenóides são constituídos de cinco unidades de carbono (unidades de isoprenos), e a nomenclatura e as classificações refletem o número de unidades de isoprenos presentes e a forma de ciclização, apresentando diversos esqueletos cíclicos ou não. Normalmente são constituídos por moléculas de dez e ou quinze carbonos (monoterpenos e sesquiterpenos, respectivamente) de mesma origem biossintética (15,17).

**Tabela 1** – Nomenclatura de terpenos de acordo com a cadeia carbônica e unidades de isopreno

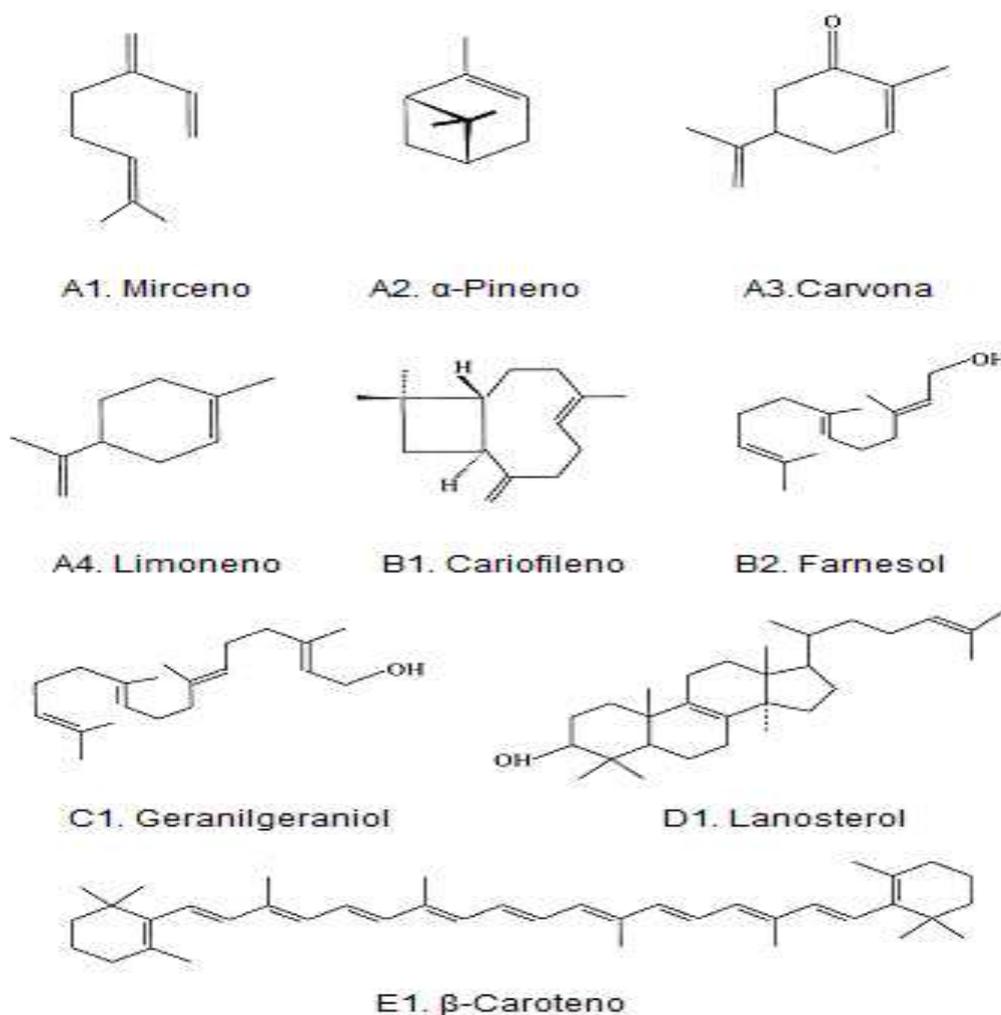
Átomos de carbono	Unidades de Isoprenos	Nomenclatura
10	2	Monoterpenos
15	3	Sesquiterpenos
20	4	Diterpenos
25	5	Sesterterpenos
30	6	Triterpenos
40	8	Tetraterpenos

Adaptado de Marriott et al, 2001.

Os monoterpenos constituem uma classe simples de isoprenóides com estrutura de 10 carbonos, constituída de 2 unidades de isopreno, sendo componentes de óleos essenciais e particularmente se acumulam em certas famílias, como Umbelliferae e Pinaceae. Constituem a subclasse que possuem compostos comuns, como o citral, linalol, cânfora e carvacrol, dentre outras de ampla utilização na indústria de cosméticos e alimentícios, além de apresentarem propriedades farmacológicas como antifúngicas, por exemplo, (15,17).

Mais de 100 esqueletos de sesquiterpenos são conhecidos e encontrados em plantas, musgos, algas e fungos. Geralmente ocorrem juntamente com monoterpenos em óleos essenciais, mas em quantidades menores, cuja acumulação nas plantas superiores se dá em estruturas secretoras especializadas, as glândulas de óleo. Em geral são menos voláteis e têm propriedades menos importantes do que os monoterpenos; no entanto, podem influenciar de forma sutil o odor onde ocorrem. Os fenilproenos são derivados das rotas metabólicas do ácido chiquímico. Apresentam estruturas formadas basicamente de um anel benzênico ligado a cadeia lateral com 3 carbonos, contendo dupla ligação, e podem apresentar grupo funcional com oxigênio (15,17).

**Figura 2** – Estrutura de alguns terpenos típicos: (A1, A2, A3, A4) Monoterpenos; (B1, B2) Sesquiterpenos; (C1) Diterpeno; (D1) Triterpeno; (E1) Tetraterpeno.



**Fonte:** Adaptado de Marriott et al, 2001.

Os óleos essenciais estão associados a várias funções necessárias à sobrevivência do vegetal em seu ecossistema, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos e predadores, e também na atração de insetos e outros agentes fecundadores, ou seja, embora não necessariamente essenciais ao organismo produtor, garantem vantagens a sua sobrevivência, perpetuação da espécie em seu ecossistema. Várias atividades biológicas têm sido atribuídas aos isoprenóides (terpenos), incluindo funções hormonais, inibidores do crescimento, pigmentos, constituintes da cadeia de transporte de elétrons (17). Muitos desses metabólicos são responsáveis pelas qualidades atribuídas aos vegetais ao longo do tempo, principalmente atributos medicinais, o que vem sendo estudado em pesquisas, tornando-se cada vez maior o interesse de se entender e controlar esses processos de síntese de metabólicos secundários tanto por parte da comunidade científica como a indústria (15,17).

## **2.5 Óleo Essencial de Manjeriço**

Tem sido relatado na literatura que o teor de óleo essencial contido em *Ocimum basilicum* depende da região geográfica (16). Normalmente há variações consideráveis entre os constituintes majoritários de uma planta para outra, principalmente pelo fato dos quimiotipos do óleo essencial de *Ocimum basilicum* serem produzidos por duas rotas bioquímicas diferentes: ácido chiquímico e rota do ácido melavônico. Na primeira, os maiores constituintes são metil chavicol, eugenol, metil eugenol e cinamato de metila, enquanto que na segunda os componentes majoritários são linalol e geraniol. O óleo essencial de manjeriço mais valorizado é o tipo Europeu (italiano), tendo como constituintes principais o linalol (40,5 a 48,2%) e metil chavicol (28,9 a 31,6%) (15). Na indústria de vitaminas, o linalol é um importante intermediário na produção de vitamina

E, e constitui, junto com o geraniol, ponto de partida para a produção da vitamina A (18).

**Figura 3** –Estruturas dos principais componentes monoterpênicos presentes no óleo essencial de *Ocimum basilicum* L.(Rosado et al, 2011).



**Fonte:** Rosado et al, 2011.

Vários estudos têm demonstrado os efeitos benéficos do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. em diferentes áreas de pesquisas biomédicas. Foi demonstrado que o óleo de manjeriço, muito usado na cozinha mediterrânea, está associado à baixa morbidade cardiovascular na região, além de combater as doenças cardiovasculares (19). Recentemente foi demonstrado em um estudo com ratos que o manjeriço possui efeitos neuroprotetores que podem ser clinicamente útil na prevenção do acidente vascular cerebral e distúrbios relacionados (20). Também foram identificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, a presença de compostos com atividade antioxidante, como os ácidos fenólicos presentes em diferentes cultivares de *Ocimum basilicum* (16,21,22). O óleo essencial de manjeriço também tem mostrados resultados promissores no controle e eliminação de pragas contra fungos e insetos em lavouras, armazenamentos de alimentos e conservação de grãos. A propriedade antifúngica foi testada com sucesso, sendo que, dos seus compostos químicos presentes no óleo o que apresentou maior atividade inibitória foi o eugenol contra *Fusarium verticillioides* na

produção de fumonisina, uma micotoxina que mata o fungo que ataca lavouras de milho e alimentos armazenados (23). Apresentou resultado satisfatório também como inseticida fumigante na forma de pó aromatizado em doses de óleo de manjerição no controle e eliminação de *Callosobruchus maculatus* que ataca lavouras e grãos de soja e feijão (24). Cada vez mais os pesquisadores têm voltado seus estudos com plantas medicinais para as áreas de bacteriologia e parasitologia com sucesso. Prova disso foram os resultados obtidos com óleo essencial de *Ocimum basilicum* cujos componentes químicos linalol e eugenol foram empregados em estudos clínicos isolados de bactérias multirresistentes de *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Pseudomonas* os quais mostraram ser uma alternativa à eliminação dessas bactérias resistentes aos fármacos disponíveis (25). Foi testado com sucesso o efeito repelente do óleo essencial de manjerição contra o carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, sendo esta uma alternativa ecologicamente viável contra esse parasita resistente aos acaricidas atuais, sendo seus quimiotipos mais eficazes o linalol, eugenol e o 1,8 – cineol, (26). Também demonstrou ser um óleo essencial com propriedades notáveis como larvicida nos componentes químicos testados como o linalol e o 1,8 – cineol contra *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* e *Anopheles subpictus* mosquitos transmissores de malária, dengue, filariose e outras enfermidades do gênero, respectivamente (27).

### **3. OBJETIVOS GERAIS**

O objetivo da pesquisa foi avaliar o efeito da hipergravidade simulada sobre a germinação, o crescimento e a produção do óleo de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.).

#### **3.1 Objetivos específicos**

- Determinar o melhor protocolo de cultivo para o *Ocimum basilicum* L.
- Comparar o número de sementes germinadas e o tamanho das plântulas submetidas à hipergravidade simulada com o grupo controle (+1G);
- Acompanhar o desenvolvimento das plântulas submetidas à simulação de hipergravidade após o plantio a céu aberto;
- Avaliar a composição de óleos essenciais extraídos pelo método de arraste a vapor em resposta à hipergravidade e em gravidade normal, utilizando o método de cromatografia gasosa associado à espectrometria de massa;

#### 4. Discussão geral

Para a simulação de hipergravidade foi empregada uma centrífuga construída no Centro de Microgravidade - FENG/PUCRS. Essa consiste em um motor fixado em uma base de giro feita em PVC de alta densidade, que apresenta nervuras para aumentar a resistência mecânica e estabilidade, comporta até 36 suportes de amostra, sendo uma em cada espaço semicircular da base. Com um diâmetro de 660 mm, a centrífuga chega a 200 rpm obtendo até +15Gz; porém, para os experimentos desse estudo foram utilizados 137 rpm, o que gerou +7Gz na borda externa. Um temporizador digital foi utilizado para controlar a programação de ligar/desligar para o sistema de programação para um período de 7 ciclos de 16 horas (repouso) seguido por 8 horas em hipergravidade.

Sete diferentes protocolos foram testados para avaliar o que teria o melhor efeito sobre as sementes de manjeriço. Esses foram: 1, 2, 3, 4, 8, 12 e 14 dias de rotação intermitente na centrífuga (8 horas a +7Gz e 16 horas a +1Gz a cada 24h). Para cada protocolo, foram empregadas quatro amostras, assim como para o grupo controle (+1Gz). Esse experimento foi realizado por um período de 14 dias, seguindo as informações do fornecedor ISLA, o qual especifica que esse é o tempo necessário para que ocorra a germinação do manjeriço. Ao final de cada dia e após 14 dias de experimento, a germinação foi avaliada usando um estereomicroscópio (modelo: AUSJENA).

As amostras para o protocolo de cada ciclo e os controles foram preparados em um recipiente de copo plástico branco de 300 ml e papel de germinação. Quinze sementes foram colocadas em cada tira de papel de germinação (18 cm x 7 cm) umidificadas previamente com água. O papel foi então manipulado com o objetivo de formar um tubo. Assim, cada amostra foi composta por 3 rolos, cada um contendo 15

sementes, totalizando 45 sementes por copo amostra. A cada copo amostra foram, então, adicionados 80 mL de água e os mesmos foram cobertos com um plástico perfurado (5 mm de diâmetro), para minimizar a perda de água. Cada grupo de tratamento, assim como o grupo controle, foi formado por 4 recipientes. Todo o experimento permaneceu sob as mesmas condições ambientais de temperatura, umidade, luz e higrometria.

A análise estatística foi realizada usando a versão do software SPSS 17.5 para testar *two-way* ANOVA. As médias de germinação foram calculadas para cada protocolo e mais o controle, e o nível de significância considerado foi de  $p \leq 0,05$  e o índice de confiabilidade foi de  $p \geq 80\%$ .

Para a realização do cultivo a céu aberto, foram empregados os 2 protocolos que apresentaram os melhores resultados em hipergravidade simulada, conforme descrito anteriormente. Após, a execução dos protocolos, as amostras foram plantadas com o papel de germinação em terra, contendo uma mistura de cama de frango e terra preta na proporção de (1:3). As amostras foram posteriormente cobertas por 1 cm de terra. Após 90 dias, foi realizada a coleta manual das folhas frescas de manjeriço a partir das 08h da manhã e terminando a coleta próximo ao meio dia. Foram coletadas somente folhas saudáveis, em sua maioria de grande tamanho, mas também foram coletadas folhas pequenas e médias. Após a coleta de folhas frescas, foi realizada a pesagem e estas foram posteriormente submetidas à extração de óleo essencial pelo método de arraste a vapor.

Para a realização de extração de óleo essencial, foi utilizado o arraste a vapor do LOPE (Laboratório de Operações Unitárias da PUCRS). Todas as extrações foram feitas no mesmo dia da coleta à tarde, no horário das 13h. O equipamento possui um balão de 5 L com uma resistência imersa, seguido do vaso extrator, onde foi colocado o material vegetal, e esse, foi acoplado a um cleveger, onde o óleo foi arrastado com o vapor,

condensado e separado. O tempo total do experimento foi de aproximadamente 2h. As amostras foram coletadas em frascos âmbar, juntamente com a água armazenada no clevenger. À essa mistura, foi adicionado 1mL de ciclohexano (Merck), para extrair o óleo da água. A fase hexênica foi coletada com uma pipeta de Pasteur e a esta foi adicionada uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro (Synth) para retirar o residual de água. Após a secagem, as amostras foram repassadas para um *vial* para serem analisadas no CG/MS. Esse método foi escolhido pelo fato de ser muito utilizado pela indústria, por ser de fácil operação e atender as exigências para a obtenção de óleos essenciais.

A análise da composição química do óleo essencial de manjeriço foi realizada através de cromatografia gasosa, acoplada a um detector de massas (equipamento Hewlett Packard – Agilent sistema GC/MS, GC modelo 7890A e detector de massas modelo 5975C). A coluna utilizada foi HP-5MS (Hewlett Packard - Agilent, 5% fenil metil silox, 30m x 250µm de diâmetro interno com espessura de filme de 0,25µm). A programação de temperatura do forno começou em 60°C, mantida por 8 min, sendo aumentada 3°C/min até atingir 180°C, permanecendo assim por 1 min. Após, aumentou-se a temperatura 20°C/min até chegar a 250°C, a qual foi então mantida por - 10min. O gás de arraste utilizado foi o Hélio com fluxo de 0,8 ml/min, temperatura do injetor 250°C, volume de injeção 1µl, no modo split, razão de split 1:55. A faixa de massa analisada foi de 40 a 450 u.m. Os compostos foram identificados através da comparação de seus espectros de massa e índices de retenção com uma biblioteca Adams, 2007.

Os resultados de todos os protocolos que foram expostos à hipergravidade simulada, assim como o grupo controle, apresentaram uma germinação média percentual maior que 70%. O controle apresentou 79% de germinação e os protocolos

que apresentaram os melhores resultados foram os que empregaram 1, 2 e 3 dias de hipergravidade simulada, tendo um percentual de germinação de 87%, 85% e 81%, respectivamente. Através da análise estatística *two-way* ANOVA, foi observado que a probabilidade de que o efeito da hipergravidade simulada afetasse a germinação das sementes foi de 99%, 94% e 85% para os tempos de hipergravidade simulada de 1, 2 e 3 dias, respectivamente. Além disso, através do teste "F" foi possível observar que houve diferença significativa entre o número de sementes germinadas no protocolo 1, 2 e 3 em comparação com o grupo controle, onde  $p = 0,001$ ;  $p = 0,003$  e  $p = 0,006$ , respectivamente. Baseado nesses resultados, os protocolos 1 e 2 foram empregados para a realização do cultivo a céu aberto. Apesar de ocorrer uma diferença significativa no número de sementes germinadas nos protocolos 1, 2 e 3 em relação ao controle, não houve diferença significativa no crescimento da raiz e da parte aérea dos 3 protocolos em relação ao controle.

O cultivo a céu aberto foi realizado com os protocolos 1 e 2, cujas coletas foram feitas entre as 14<sup>a</sup> e 15<sup>a</sup> semana, sempre no período da manhã e em dia seco. Os resultados obtidos encontram-se na figura 1 (Cap. 5, pg. 36) a centrifuga 2 produziu maiores quantidades de plantas germinadas e flores. Essa nítida diferença em relação aos outros grupos, ocorreu devido a grandes números de ramificações no caule dos manjericões que esse grupo desenvolveu durante seu crescimento.

A massa de folhas frescas de cada extração foi de 500g para a primeira coleta (Centrifuga 1), 550g para a segunda coleta (Controle 1), 600g para a terceira coleta (Controle 2) e 1030g para a quarta coleta (Centrifuga 2). A quantidade total de óleos essenciais foi de 0,3 mL para a centrífuga 2 e para os demais grupos foi de 0,2 mL. O rendimento de óleos essenciais foi de 0,30% para a centrifuga 1; 0,33% para o controle 1; 0,36% para o controle 2; e 0,40% para a centrifuga 2.

Os resultados das análises da composição química do óleo essencial de manjeriço por CG/MS dos 4 grupos encontram-se nas tabelas 1 a 4 (Cap. 5, pg. 43). Os três principais constituintes foram o eugenol, linalol e 1.8-cineol, sendo o eugenol o composto químico majoritário predominante. Esses três compostos foram responsáveis por mais de 80% da composição dos óleos essenciais dos manjeriços, tanto em hipergravidade simulada como nos seus respectivos controlos. Também foram detectados outros compostos, mas em quantidades inferiores a 3%.

## 5. Artigo científico

**Titulo:** EFFECT OF SIMULATED HYPERGRAVITY ON THE GERMINATION, GROWTH AND ESSENTIAL OIL PRODUCTION OF BASIL (*OCIMUM BASILICUM* L.)

Submetido ao Journal of Biotchnology

Fator de impacto de 2013: 2.884

Word acount: 4532

Ms. Ref. No.: JBIOTEC-D-15-00128

Title: EFFECT OF SIMULATED HYPERGRAVITY ON THE GERMINATION, GROWTH AND ESSENTIAL OIL PRODUCTION OF BASIL (OCIMUM BASILICUM L)

Journal of Biotechnology

Dear MOSER,

Your submission entitled "EFFECT OF SIMULATED HYPERGRAVITY ON THE GERMINATION, GROWTH AND ESSENTIAL OIL PRODUCTION OF BASIL (OCIMUM BASILICUM L)" has been assigned the following manuscript number: JBIOTEC-D-15-00128.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jbiotec/>.

Your username is: [viniciusmosergoulart@hotmail.com](mailto:viniciusmosergoulart@hotmail.com)

If you need to retrieve password details, please go to:

[http://ees.elsevier.com/jbiotec/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/jbiotec/automail_query.asp)

Thank you for submitting your work to this journal.

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Kind regards,

A. Pühler

Chief Editor

Journal of Biotechnology

EFFECT OF SIMULATED HYPERGRAVITY ON THE GERMINATION, GROWTH  
AND ESSENTIAL OIL PRODUCTION OF BASIL (*OCIMUM BASILICUM* L)

Vinícius Moser Goulart<sup>1\*</sup>, Thais Russomano<sup>2</sup>, Eduardo Cassel<sup>3</sup>, Aline Machado Lucas<sup>3</sup>  
Marlise Araújo dos Santos<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Pharmaceutical Biotechnology Professional Master's Degree Program – School of Pharmacy – PUCRS; <sup>2</sup>Microgravity Centre/FENG, <sup>3</sup>Joan Vernikos Aerospace Pharmacy Laboratory, <sup>4</sup>Unit Operations Laboratory – Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

School of Pharmacy – PUCRS; Av. Ipiranga, 6681, Building. 12, CEP: 90619-900, Porto Alegre, Brazil.

\*Corresponding Author

\*E-mail: [vinicius.goulart@acad.pucrs.br](mailto:vinicius.goulart@acad.pucrs.br) or [viniciusmosergoulart@hotmail.com](mailto:viniciusmosergoulart@hotmail.com)

Tel: +55 51 98350690 or +55 51 3320-3500 - ext. 6369. Fax: +55 51 3320-3612.

E-mail: [marlise.santos@pucrs.br](mailto:marlise.santos@pucrs.br) or [marliseas@hotmail.com](mailto:marliseas@hotmail.com)

Tel: +55 51 98287743 or +55 51 3320-3500 - ext. 6369. Fax: +55 51 3320-3612.

E-mail: [Thais.russomano@pucrs.br](mailto:Thais.russomano@pucrs.br)

Tel: +55 51 3320-3500 - ext. 6369. Fax: +55 51 3320-3612.

E-mail: [cassel@pucrs.br](mailto:cassel@pucrs.br)

Tel: +55 51 3353-4585.

E-mail: [aline.lucas@pucrs.br](mailto:aline.lucas@pucrs.br)

Tel: +55 51 3353-4585.

## ABSTRACT

In this study, two experiments were performed with the aim of studying germination in simulated hypergravity and open-air cultivation, to evaluate the growth of the basil, its yield and essential oil composition. The extraction of the essential oils was carried out by steam distillation in a Clevenger apparatus. Quantitative and qualitative evaluation of the compounds was performed by gas chromatography coupled to a mass spectrometer detector (GC/MS). The mean values for germination under the effect of hypergravity simulation in protocols 1, and 2, ranged from 81% to 87%. After this stage, the seeds exposed to simulated hypergravity were cultivated in the open-air and the fresh basil leaves were collected after 90 days to obtain the essential oils. The overall yield of oil was 0.2mL to 0.3mL and the essential oil was 0.3% to 0.4%. The largest and most predominant compound in this research was eugenol, ranging from 46% to 62%, with the second largest being linalool, which ranged from 22% to 28%. Further research in this area is essential to understand the real impact of simulated hypergravity on basil, and its effect on auxins and gene expression.

**Keywords:** *Ocimum basilicum*, hypergravity, germination, essential oil extraction.

## 1. INTRODUCTION

The essential oils market is thriving in countries with high biodiversity, such as Brazil, and that have conditions to add value to raw materials, transforming them into products. If the country guarantees technological development in this area, it can leave the position of supplier of raw materials and pass to a position as a producer of plant extracts, essential oils and active ingredients of high added value. Data from the consultancy *Global Industry Analysts* (2013) indicates that the market of products using plants as raw material (including foods and cosmetics, in addition to medicines) reached US\$ 93 billion in 2014. Currently, about 80% of the European population use herbal medicines, as do more than 40% of people in Asian countries.

The international market for essential oils has an annual turnover of US\$ 1.8 billion and the Brazilian participation in this market is only 0.1%, mainly concentrated in citrus oils, which are byproducts of the production of concentrated orange. The great Brazilian biodiversity, still little explored in relation to the chemical composition of its flora, places Brazil in a very promising situation to increase its future participation in the essential oils market. Several Brazilian native species, albeit on a small scale, are already being exploited for the extraction of these oils, which are used by the cosmetics and perfume industries for the manufacture of products for the domestic and foreign markets (Biasi & Deschamps, 2009).

In addition to the cosmetics and perfume industries, essential oils have wide possible use, among them, the pharmaceuticals industry, as they have therapeutic properties already proven in agriculture where they are used for the biological control of diseases and pests (Pereira & Moreira, 2011). The continental size of Brazil makes it more difficult to define the behavior of the aromatic species as the huge climatic and soil diversity of the country can cause differences in the development and production of secondary metabolites. On the other hand, this also permits favorable microclimates to be located for the cultivation of diverse species, ranging from tropical to temperate climates (Biasi & Dechamps, 2009). The achievement of research in aromatic plants in Brazil, through its practical application, could result in the promotion of new agricultural crops, bringing to farmers a new source of income and diversification of agricultural activity.

Earth's gravitational force has had a profound effect on the development of life on our planet over millions of years and has shaped the anatomy and physiology of all

living beings, including humans, animals and plants. Earth's gravity has always been an important factor in regulating the growth and development of plants. Gravitational forces greater than +1Gz have been used to study the role of gravity on plant growth. There are two hypotheses that attempt to explain the mechanism of gravity perception in plants. The *starch-statolith* hypothesis states that dense bodies of starch found in root cells, called amyloplasts, act as plant gravity sensors (Aubay-Centis, 2003; Fizzle & Kiss, 2001). The other hypothesis of *protoplast pressure* argues that the perception of gravity is caused by the weight of the entire contents of root cells.<sup>6-8</sup> However, so far, most of the data regarding the influence of gravity on plant physiology and morphology have been obtained when the plant is submitted to changes in orientation of the gravity vector (Aubay-Centis, 2003; Kiss, Edelman & Wood, 1999). To this end, experiments in a space environment provide microgravity conditions, while those using centrifugation techniques are related to hypergravity (Soga et al., 2004; Soga et al., 2005).

Hypergravity experiments can reveal the mechanisms involved in animal and plant tissues or cells in response to changes in gravitational force. Studies conducted by Santos et al. (2012) have shown an increased number of carrot seed germination, *Daucus carota L.* under the influence of simulated hypergravity. Similar results were found in experiments using rocket plant *Eruca sativa Mill.*, by Russomano et al. (2007). The findings of these experiments showed that simulated hypergravity generated an increase in the number of germinated seeds, when compared with the control group, probably due to the effect of hypergravity on auxins (plant hormones). Histological sections of rocket plant cotyledons submitted to hypergravity simulation demonstrated a different distribution in the essential oil, when compared to the control group (Russomano et al., 2007). Basil (*Ocimum basilicum L.*), also known as Italian basil and sweet basil, belongs to the Lamiaceae family. It is an annual or perennial herbaceous aromatic plant, native to tropical Asia and prefers climates ranging from warm to mild. It is a strong and leafy plant with a well-branched stem. It reaches 40cm to 50cm during its adult phase. The leaves are large and light green when the plant is young and a darker green as an adult. Flowering is late and the harvest can be performed at different times of the year. The leaves are very aromatic. The best known use of basil is in cooking to flavor various types of food, but its essential oils are also extracted. As a treatment option, studies have shown that basil presents antibacterial, antifungal, antispasmodic, analgesic, antipyretic, anti-inflammatory and antihypertensive

properties. Basil leaves are already used to treat skin rashes, insect bites and other skin problems, as well as being used to control blood sugar levels (Pereira & Moreira, 2011; Labra et al., 2004).

Given the large number of therapeutic applications presented by basil and its use in both national and international cuisine, this research aimed to evaluate the effect of simulated hypergravity on germination, growth in open-air cultivation and production of essential oils.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 HYPERGRAVITY SIMULATION**

A centrifuge built at the Microgravity Centre, FENG/PUCRS, was used for simulation of hypergravity. It consists of a motor fixed to a rotating base made of high density PVC and contains up to 36 sample holders – divided over 3 tiers of 12 samples each. The centrifuge has a diameter of 660mm and can achieve 200 rpm, giving up to +15Gz. However, for the experiments of this study a rotation of 137 rpm was used, which created +7Gz at the outer edge where the sample holders were located. A digital timer device was used to control the on/off program for a period 16 hours (rest), followed by 8 hours in simulated hypergravity per day for the different protocols used.

Seven protocols were tested to assess which would have the best effect on the basil seeds. These were: 1, 2, 3, 4, 8, 12 and 14 days of intermittent rotation in the centrifuge (8h at +7Gz and 16h at +1Gz, every 24h). This experiment was conducted over a 14-day period, following information set out by the seed supplier ISLA, specifying that this is the time required for basil seed germination to occur. At the end of each day and after 14 days of experiment, germination was evaluated using a stereomicroscope (model: AUSJENA).

The samples for each cycle protocol and the controls were prepared in a recipient 300mL white plastic cup and using germination paper. Fifteen seeds were located on each strip of germination paper (18 cm x 7 cm), previously moistened with water. The paper was then rolled to form a tube. Each sample consisted of 3 tubes, each containing 15 seeds, totaling 45 seeds per sample cup. To each cup was then added 80 mL of water and they were covered by perforated plastic (5mm thickness) to minimize water loss. The hypergravity and control groups were each formed of 4 containers. The

entire experiment remained under the same environmental conditions of temperature, moisture level, light and humidity.

Statistical analysis was performed using SPSS version 17.5 software to test *two-way* ANOVA. The level of significance adopted was  $p \leq 0.05$  and a reliability index of  $p \geq 80\%$ .

## **2.2 OPEN-AIR CULTIVATION**

Two protocols were employed for the open-air cultivation, with these being those that presented the best results in terms of seed germination during hypergravity simulation, as previously described. The samples were planted with the germination paper in soil, comprising of a mixture of chicken litter and potting soil in a 1:3 proportion. The samples were then covered by 1 cm of earth. After 90 days, a manual collection of fresh basil leaves was carried out, between the hours of 8am and noon. Only healthy leaves were collected, being mostly of a large size, but some small and medium sized leaves were also gathered. After collection of the fresh leaves, they were weighed and subsequently submitted to extraction of the essential oils by steam distillation.

## **2.3 ESSENTIAL OIL EXTRACTION BY STEAM DISTILLATION**

The process of extraction of the essential oils by steam distillation was carried out at the LOPE (Laboratório de Operações Unitárias - Unit Operations Laboratory, PUCRS). All extractions were performed at 1pm in the afternoon of the same day as the leaf collection. The equipment consisted of 5L flask with a resistor immersed, connected to an extractor vessel where the plant material was placed, and then coupled to a Clevenger apparatus, where the vaporized oil was condensed and separated. The total time for the extraction process was 2h. The samples were collected in amber glass bottles, together with the water stored in the Clevenger apparatus. A 1mL amount of cyclohexane (Merck) was added to this mixture to extract oil from the water. The hexatic phase was collected with a Pasteur pipette and to this was added a small amount of anhydrous sodium sulfate (Synth) to eliminate residual water. After drying, the samples were transferred to a vial for analysis by gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS). This method was chosen as it is widely used in the industry, is easy to operate and meets the requirements for obtaining essential oils.

## 2.4 ANALYSIS OF THE ESSENTIAL OILS BY GC/MS

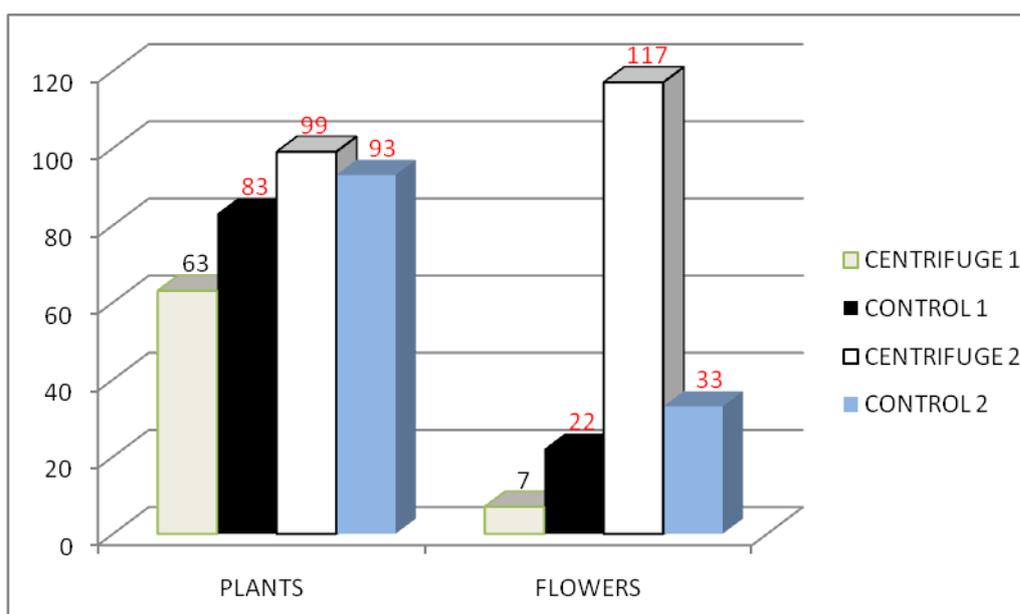
A chemical composition analysis of the basil essential oil was performed by gas chromatography, coupled to a mass detector (Hewlett Packard-Agilent GC/MS system, GC model 7890A and mass detector model 5975C). The column used was HP-5MS (Hewlett Packard - Agilent, 5% phenyl methyl silox, 30m x 250 $\mu$ m internal diameter with film thickness of 0.25 $\mu$ m). The oven temperature program commenced at 60°C, maintained for 8 min and increased by 3°C/min until reaching 180°C, remaining at that temperature for 1 min. Thereafter, the temperature was increased by 20°C/min until reaching 250°C, which was maintained for 10min. The carrier gas used was helium with a flow of 0.8 ml/min, injector temperature of 250°C, injection volume of 1 $\mu$ l, in split mode, split ratio 1:55. The analyzed mass range was 40-450 u. The compounds were identified through comparison of their mass spectra and retention indexes with the Adams library (2007).

## 3. RESULTS

The control group presented 79% germination, while the hypergravity simulation groups showed better results for the protocols that ran for 1, 2 and 3 days, with a percentage germination of 87%, 85% and 81%, respectively. Statistical analysis showed a probability that the effect of simulated hypergravity affected seed germination was 99%, 94% and 85% for 1, 2 and 3 days, respectively. The findings showed a significant difference between the number of germinated seeds in relation to the control group for protocols 1 ( $p = 0.001$ ), 2 ( $p = 0.003$ ) and 3 ( $p = 0.006$ ). Based on these results, protocols 1 and 2 were selected to be used for the open-air cultivation. Although there were an increased number of seed germinations in protocols 1, 2 and 3 in comparison to the controls, no significant difference in the growth of the roots and shoots for the 3 protocols in comparison to the control was found.

### 3.1 OPEN-AIR CULTIVATION

Cultivation was carried out in the open-air for protocol groups 1 and 2, with collections being made between the 14th and 15th week, always in the morning and on a dry day. Results are shown in Figure 1, with centrifuge 2 having produced higher quantities of germinated plants and flowers. This clear difference compared to the other groups was due to the large numbers of branches on the stem of the basil that this group developed during its growth.



**Figure 1:** Open-air experiment for the number of plants grown and flowers produced in the different experimental groups.

### 3.2 EXTRACTION AND ANALYSIS OF THE ESSENTIAL OILS

The mass of the fresh leaves after extraction was 500g for the first collection (centrifuge 1), 550g for the second collection (control 1), 600g for the third collection (control 2) and 1030g for the fourth collection (centrifuge 2). The total quantity of essential oils was 0.3mL for centrifuge 2 and 0.2mL for the other groups. The essential oils yield was 0.30% for centrifuge 1; 0.33% for control 1; 0.36% for control 2; and 0.40% for centrifuge 2.

The results of chemical composition analysis of the basil essential oil by GC/MS for the 4 groups are presented in Tables 1 to 4. The three main constituents were

eugenol, linalool and 1,8-cineole, with eugenol being the most predominant. These three compounds were responsible for more than 80% of the basil essential oil composition, both in the simulated hypergravity and control groups. Other compounds were also detected but in quantities less than 3%.

#### 4. DISCUSSION

The germination process integrates events that begin with the absorption of water by the quiescent seeds and ends when part of the embryonic tissue, usually the radical, undergoes elongation. Temperature and light are considered environmental factors of fundamental importance in the control of germination. Temperature influences the germination process, especially by altering the rate of water absorption and modifying the chemical reaction velocities that will stimulate the deployment, the storage transport and the resynthesis of substances of the seedling (Lima et al., 2007). Basil seeds are very small and considered to be photoblastic, i.e. there are 3 factors that contribute to the germination of basil seeds: water, light and temperature. This may explain why only the protocols of 1, 2 and 3 days exposure of the basil to simulated hypergravity presented better germination results, as the seeds of these protocols had more time to rest, and to capture the light and water for germination. The need for the seeds to germinate in the presence of light causes them to germinate only when they are in the surface layers of the soil where light can reach them. Therefore, if a positive photoblastic seed is buried, it will require the soil to be removed to promote germination (Lima et al., 2007). In this study, although the basil seeds were covered with a minimum amount of soil, as specified in the literature (Biasi & Deschamps, 2009; Pereira & Moreira, 2011), there was no observed alteration in the process of germination. This is in accordance with the ISLA seed supplier who indicated an expected germination percentage of over 75%, and the results of this study showed the lowest germination percentage to be 79% in the control group.

Soga et al. (2005) in their research with *Arabidopsis thaliana* and Azuki bean seeds, reported that hypergravity did not provide an extra stimulus for germination and the plant responses could be seen as a normal physiological response. They did detect in their studies, however, that changes induced by hypergravity in the growth and

properties of the cell walls are mediated by mechanoreceptors present in the plasma membrane, which are responsible for plant gravitropism.

The results of this study, however, differ from that presented by Soga et al., (2005). It was observed in the simulated hypergravity protocol groups for the first 3 days, +7Gz for 8h and 16h rest, that they presented better and higher results than the control group in the germination process, with the control group presenting a germination of 79.4%, and the protocols of 1, 2 and 3 days of centrifugation having a germination percentage of 87%, 85% and 81%, respectively. This fact suggests that basil seeds do not support well the physiological stress caused by hypergravity, and therefore, the shorter the centrifuge time and the longer the resting period, the faster the seeds will recover from possible physiological stress caused by hypergravity. Similar results were found by Santos et al., (2012) with carrot seeds exposed to intermittent hypergravity simulation over 4, 11 and 18 days, which showed greater and superior germination than those in terrestrial gravity (+1Gz). Likewise, Russomano et al., (2007) also found a significant increase in the germination of *Rúcula sativa Mill*, suggesting that the plant hormone auxin may respond to the stimulus of hypergravity, influencing plant growth. Auxins are characterized by their ability to induce cell elongation in the subapical region of branches. In addition, it affects the physiological processes, including phototropism, geotropism, fruit development and gender expression.

Observing the data in Figure 1, it was found that centrifuge 2 group presented a much higher number of flowers and leaf mass than the control group 2, which could corroborate the theory of Russomano et al., (2007). The same did not repeat itself in relation to the control 1 and centrifuge 1 groups. During open-air plantation, these groups experienced the action of wind gusts that affected the protection cover; this did not happen with the control 2 and centrifuge 2 groups. Consequently, despite the attempt to standardize the experimental conditions, this climatic event may have affected the development of groups 1. Therefore, in order to confirm the effects of simulated hypergravity on the basil cultivation, it is necessary to quantify the auxins as the next experimental step.

In addition, research by Aubay-Centis et al. (2003) showed that *Arabidopsis thaliana* seeds endured a simulated hypergravity of +5Gz, conducted in the dark for 30 minutes over 6 days. According to the authors, changes in gravitational forces affect plant cell activity, among them gene expression, which can be modulated very quickly. They further state that alterations in gene expression in response to changes in

gravitational force are not an isolated process and involve genes linked to the cell wall, cytoskeleton and auxins. Furthermore, the distinct expression patterns allow us to distinguish between different 'classes of genes', some of which are dependent on the sequence of alterations in gravitational forces. In this sense, evaluation of gene expression becomes a fundamental factor in the follow-up of this research.

In this study, eugenol was the main compound encountered, possibly due to the time of harvest, which was carried out between 14 and 15 weeks after planting. Experiments conducted by Labra et al., (2004) and Huang et al., (2011) demonstrated that the major compound found in Italian basil (Genovese-type, large-leaf Italian basil) was linalool, with eugenol being the second largest. According to the authors, the extraction of fresh leaves must be done between the 3rd and 5th week after planting, with the basil at this stage being young and small (measuring 8-12cm), having little or no offshoots from the main stem, and leaves that are still not mature. On the other hand, essential oil yields tend to be low, irrespective of the quantity of fresh leaves used for extraction. Huang et al., (2011) in their studies of *O. basilicum* cv. Italian large leaf found the quantity of linalool and eugenol was 54% and 30%, respectively. Labra et al., (2004) when evaluating the genetic polymorphism in cultivars of *O. basilicum*, observed low or even no genetic variability due to reproduction and autogamous propagation. The authors also conducted a genetic taxonomic study to classify the cultivars, as cultivars of *O. basilicum* can have very similar agronomic characteristics. For example, Genovese and Italian large leaf varieties have the same aroma, major chemotypes (linalool and eugenol), size and flower (white), and are only differentiated by the leaves, with one having oval-shaped, dark green leaves (Genovese). The authors extracted the essential oils after 90 days, identifying between 19%-37% linalool and 28%-30% eugenol as the major compounds. Their data corroborates the findings of this study as, with a similar time of collection and extraction, the percentage of linalool found was 22%-28%, although the percentage of eugenol 46%-62% was found to be higher.

Eugenol was predominant, possibly due to the soil environmental conditions and its biosynthesis. The biosynthesis of constituents and production of essential oils occurs in the glandular trichomes present on the surface of basil leaves. With the maturing and ageing of the leaves, there is a decrease in glandular trichomes at the same time as the leaves gain weight. In general, a young leaf positioned at the top of the main stem contains a lower yield of essential oil than an older leaf found lower down the stem;

however, the same young leaf with less weight has a higher concentration of essential oils than the older leaf. This is because the concentration of essential oil decreases by evaporation as the leaf matures in size, weight and age (Fischer et al., 2011).

In biosynthesis, the compounds are mostly derived from each other. Methyl-eugenol and methyl-chavicol are methylated products of eugenol and chavicol. This conversion happens with the enzymes eugenol-O-methyltransferase (EOMT) and chavicol-O-methyltransferase (COMT), respectively. The level of activity of these enzymes in the difference of chemotypes is one of the major factors affecting the distinction of phenylprophen in basil essential oils (Fischer et al., 2011). The authors in their research of basil leaves explain that this conversion process is not so simple and differs greatly from one leaf to another; often the conversion does not occur and higher concentrations of eugenol are maintained as a result. The authors demonstrated that the position of the basil leaves on the main stem affected the essential oil composition and the process of maturing differs between the leaves. Nonetheless, the reason behind this difference was not clarified and the authors determined that more research is required to ascertain if this can be caused by environmental and/or hormonal factors.

## 5. CONCLUSIONS

In conclusion, it is believed that simulated hypergravity performed intermittently for a period of 1 and 2 days affects both the germination and growth of basil. It is also suggested that this exposure has a positive influence on plant development, in view of the larger amount of flowers and mass produced. However, the production of basil essential oils was not affected, although the production of eugenol was observed to be higher, probably due to environmental or hormonal factors. Studies assessing the response of auxin and gene expression to simulated hypergravity may be important to better understand the effects of increased gravity on basil.

### Acknowledgements

Many thanks to Marlise A. S. for advising me during this research, Thais R. for reviewing it and both Eduardo C. and Aline M. for the aid in chemical engineering.

## REFERENCES

Icon Group International, Inc. 2013. The 2013 Report on Herbal Supplements and Remedies: World Market Segmentation by City. Paperback, June 19.

BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. 2009. Herbs: the essential oil production to cultivation. Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 160 p.

PEREIRA, R. C. A; MOREIRA, A. L. M. 2011. Basil: cultivation and use. 31 p. (Documentos/Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 2179-8184, 136).

AUBAY-CENTIS, S.; GASSET, G.; MAZARS, C.; RANJEVA, R.; GRAZIANA, A. 2003. Changes in gravitational forces induce modifications of gene expression in *A. thaliana* seedlings. *Planta*. vol. 218, n.2, p. 179 – 185.

FITZELLE, K. J.; KISS, J. Z. 2001. Restoration of gravitropic sensitivity in starch-deficient mutants of *Arabidopsis* by hypergravity. *Journal Exp. Bot.* vol. 52, n. 355, p. 265 – 75.

KISS, J. Z.; EDELMAN, R. E.; WOOD, P .C. 1999. Gravitropism of hypocotyls of wild-type and starch-deficient *Arabidopsis* seedling in spaceflight studies. *Planta*, vol. 209, n. 1, p. 96 – 103.

SOGA, K. WAKABAYASHI, K.; KAMISAKA, S.; HOSON, T. 2005. Mechanoreceptors rather than sedimentable amyloplasts perceive the gravity signal in hypergravity-induced inhibition of root growth in azuki bean. *Funct. Plant Biol.* vol. 32, n. 2, p. 175 – 179.

SOGA, K.; WAKABAYASHI, K.; KAMISAKA, S.; HOSON, T. 2004. Gravitropism in growth inhibition of plant shoots under hypergravity conditions produced by centrifugation is independent of that in gravitropism and may involve mechanoreceptors. *Planta*. vol .218, n. 6, p. 1054 – 1061.

SANTOS, M. A dos; FACHEL, F. N. S., NAVA, M. J. A.; ASTARITA, L. V.; COLLIN, P.; RUSSOMANO, T. 2012. Effect of hypergravity simulation on carrot germination and growth. *Aviation, space and environmental medicine*, vol. 83, n°10, October.

RUSSOMANO, T.; RISSATTI, M. R; COELHO, R. P.; SCOLARI, D.; SOUZA, D.; PRÁ-VELEDA, P. 2007. Effects of Simulated Hypergravity on Biomedical Experiments. *IEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*.

LABRA, M.; MIELE, M.; LEDDA, B.; GRASSI, F.; MAZZEI, M.; SALA, F. 2004. Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. Plant Science. n. 167, p. 725 – 731.

ADAMS, R.P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography mass spectrometry. 4<sup>o</sup> edition. Illinois: Allure. 804p.

LIMA, M. L. de S; SOUZA, B. S. de; OLIVEIRA, A. M. de; TORRES, S. B. 2007. Effect of temperature and light on *Ocimum basilicum* L. seed germination. Caatinga (Mossoró, Brazil), v.20, n.4, p.31-33.

Z. HUANG, B. WANG, D.G. MORTLEY, T. MINDINGALL, C.K. BONSI, W.A. HILL, and C.E. MORRIS. 2011. Chemical Characteristics of Essential Oil from Five Basil Cultivars Grown Hydroponically in a Controlled Environment Using the Nutrient Film Technique. International Journal of Applied Science and Technology. Vol. 1, No. 6; November.

FISCHER, R.; NITZAN, N.; DAVID, C.; RUBIN, B.; DUDAI, N. 2011. Variation in essential oil composition within individual leaves of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) is more affected by leaf position than by leaf age. J. Agric. Food Chem., 59, 4913 – 4922.

**Table 1** – Compounds present in the centrifuge group 1 essential oil, identified by GC/MS analysis.

<b>Compound*</b>	<b>RI**</b>	<b>%Area***</b>
Sabinene	969	0.0831
$\beta$ -Pinene	972	0.1381
Myrcene	988	0.1411
Sylvestrene	1025	0.1148
1,8-Cineole	1028	5.1517
E- $\beta$ -Ocimene	1047	0.5961
$\gamma$ -Terpinene	1065	0.1546
n-Octanol	1071	0.1218
Terpinolene	1085	0.0776
Linalool	1100	28.3297
Camphor	1141	0.3661
Borneol	1162	0.4071
p-Mentha-1,5-dien-8-ol	1164	0.2312
Terpinen-4-ol	1174	0.1083
$\alpha$ -Terpineol	1188	1.2230
Octanol acetate	1211	0.0934
Bornyl acetate	1283	0.6380
Eugenol	1358	49.3856
Methyleugenol	1403	1.0094
$\alpha$ -trans-Bergamotene	1433	3.0933
$\alpha$ -Guaiene	1436	0.2007
cis-Muurolo-3,5-diene	1443	0.1150
$\alpha$ -Humulene	1450	0.3111
E- $\beta$ -Farnesene	1455	0.4197
cis-Cadina-1(6),4-diene	1460	0.1777
$\gamma$ -Muurolole	1478	1.0704
Bicyclogermacrene	1493	0.5185
$\alpha$ -Bulnesene	1502	0.8443
$\gamma$ -Cadinene	1511	0.8332
$\beta$ -Sesquiphellandrene	1521	0.1715
epi- $\alpha$ -Cadinol	1638	2.2440
Total Identified		98.3699

\* Compounds identified by comparison of their mass spectra and retention indices with the Adam's library (2007).

\*\* Retention Index calculated for a range of alkanes.

\*\*\* Percentage area of each peak in relation to the chromatogram total area.

**Table 2** – Compounds present in the control group 1 essential oil, identified by GC/MS analysis.

<b>Compound*</b>	<b>RI**</b>	<b>%Area***</b>
1,8-Cineole	1028	6.2910
E- $\beta$ -Ocimene	1047	0.5684
Linalool	1099	26.2804
Camphor	1141	0.3307
Borneol	1163	0.2922
p-Mentha-1,5-dien-8-ol	1165	0.2205
Terpinen-4-ol	1175	0.1572
$\alpha$ -Terpineol	1188	1.1511
Octanol acetate	1211	0.1369
Bornyl acetate	1283	0.7373
Eugenol	1357	55.5365
Methyleugenol	1403	1.2997
$\alpha$ -trans-Bergamotene	1433	2.3883
$\alpha$ -Humulene	1450	0.2232
E- $\beta$ -Farnesene	1455	0.3203
$\gamma$ -Muurolene	1478	0.7756
Bicyclogermacrene	1493	0.3599
$\alpha$ -Bulnesene	1502	0.5565
$\gamma$ -Cadinene	1511	0.5700
epi- $\alpha$ -Cadinol	1638	1.4857
<b>Total Identified</b>		<b>99.6815</b>

\* Compounds identified by comparison of their mass spectra and retention indices with the Adam's library (2007).

\*\* Retention Index calculated for a range of alkanes.

\*\*\* Percentage area of each peak in relation to the chromatogram total area.

**Table 3** – Compounds present in the centrifuge group 2 essential oil, identified by GC/MS analysis.

<b>Compound*</b>	<b>RI**</b>	<b>%Area***</b>
$\beta$ -Pinene	972	0.2197
Myrcene	989	0.2061
1,8-cineole	1028	7.6978
E- $\beta$ -Ocimene	1047	0.6069
Linalool	1099	21.7155
Camphor	1141	0.3582
Terpinen-4-ol	1175	0.2711
$\alpha$ -Terpineol	1188	1.1446
Bornyl acetate	1283	0.5212
Eugenol	1357	62.5606
Methyleugenol	1403	0.5830
$\alpha$ -trans-Bergamotene	1433	1.5559
$\gamma$ -Muurolene	1478	0.4101
Bicyclogermacrene	1493	0.2144
$\alpha$ -Bulnesene	1502	0.3522
$\gamma$ -Cadinene	1511	0.3755
epi- $\alpha$ -Cadinol	1638	1.0502
<b>Total Identified</b>		<b>99.8429</b>

\* Compounds identified by comparison of their mass spectra and retention indices with the Adam's library (2007).

\*\* Retention Index calculated for a range of alkanes.

\*\*\* Percentage area of each peak in relation to the chromatogram total area.

**Table 4** – Compounds present in the control group 2 essential oil, identified by GC/MS analysis.

<b>Compound*</b>	<b>RI**</b>	<b>%Area ***</b>
Sabinene	969	0.2544
$\beta$ -Pinene	972	0.4318
Myrcene	989	0.3987
Sylvestrene	1026	0.2748
1,8-Cineole	1028	9.1823
E- $\beta$ -Ocimene	1047	1.1832
$\gamma$ -Terpinene	1065	0.1639
n-Octanol	1071	0.1212
Terpinolene	1085	0.1410
Linalool	1100	28.5875
Camphor	1141	0.4233
Borneol	1163	0.3052
p-Mentha-1,5-dien-8-ol	1165	0.2392
Terpinen-4-ol	1175	0.1489
$\alpha$ -Terpineol	1188	1.2203
Octanol acetate	1211	0.1944
Bornyl acetate	1283	0.7535
Eugenol	1358	46.9591
Methyleugenol	1403	0.8095
$\alpha$ -trans-Bergamotene	1433	2.7406
$\alpha$ -Guaiene	1436	0.1590
cis-Muurolo-3,5-diene	1443	0.0967
$\alpha$ -Humulene	1450	0.2183
E- $\beta$ -Farnesene	1455	0.2116
cis-Cadina-1(6),4-diene	1460	0.1210
$\gamma$ -Muurolole	1478	0.8147
Bicyclogermacrene	1493	0.3626
$\alpha$ -Bulnesene	1502	0.5995
$\gamma$ -cadinene	1511	0.6774
$\beta$ -Sesquiphellandrene	1521	0.1293
epi- $\alpha$ -Cadinol	1638	1.4965
<b>Total Identified</b>		<b>99.4198</b>

\* Compounds identified by comparison of their mass spectra and retention indices with the Adam's library (2007).

\*\* Retention Index calculated for a range of alkanes.

\*\*\* Percentage area of each peak in relation to the chromatogram total area.

## 6. Considerações finais

O processo de germinação incorpora eventos que se iniciam com a absorção de água pela semente quiescente e termina quando uma parte do embrião usualmente a radícula, sofre alongamento. A temperatura e a luz são consideradas fatores ambientais de fundamental importância no controle da germinação. A temperatura influi no processo de germinação, especialmente por alterar a velocidade de absorção de água e modificar as velocidades das reações químicas que irão acionar o desdobramento, o transporte de reservas e a ressíntese de substâncias para a plântula (30). As sementes de manjerição são muito pequenas e consideradas fotoblásticas, ou seja, são 3 fatores que contribuem para a germinação das sementes de manjerição: a água, luz e temperatura. Isso pode explicar o porquê de apenas os protocolos de 1, 2 e 3 dias de exposição do manjerição à hipergravidade simulada apresentam melhores resultados de germinação, pois as sementes desses protocolos tiveram maior tempo para repouso, para captar luz e água, para a germinação. A necessidade dessas sementes de germinar na presença de luz faz com que elas o realizem apenas nas camadas superficiais do solo, onde a luz pode atingi-las. Logo, se uma semente fotoblástica positiva estiver enterrada, é necessário que a terra seja revolvida para promover a germinação (30). Nesse estudo, apesar de as sementes de manjerição terem sido cobertas com uma quantidade mínima de solo, conforme especificado na literatura, (2,3), não foi observada qualquer alteração em seu processo de germinação, pois, segundo o fornecedor (ISLA), era esperado um percentual de germinação superior a 75% e, nos experimentos testados, o que apresentou menor percentual de germinação foi o grupo controle, com 79%.

Soga et al. (7,8), em suas pesquisas com sementes de *Arabidopsis thaliana* e feijão Azuki, relataram que a hipergravidade não promoveu um estímulo extraordinário

para a germinação e que as respostas de plantas pode ser reconhecido como respostas fisiológicas normais, embora ele tenha detectado em seus estudos que as mudanças induzidas pela hipergravidade em crescimento e as propriedades da parede celular são mediados por mecanorreceptores presentes na membrana plasmática, os quais são responsáveis pelo gravitropismo das plantas.

Nessa pesquisa, no entanto, os resultados encontrados divergem dos estudos apresentados por Soga et al. (7,8). Foi observado que os 3 primeiros dias de protocolo em hipergravidade simulada a +7Gz em 8 horas de centrifuga e 16 horas de repouso apresentaram resultados significativamente melhores e superiores ao grupo controle no processo de germinação, tendo como o controle de 79%, e os protocolos 1, 2 e 3 dias de centrifuga em hipergravidade simulada, tendo um percentual de germinação de 87%, 84% e 81%, respectivamente. Esse fato sugere que as sementes de manjeriço não suportam muito tempo ao estresse fisiológico provocado pela hipergravidade, e que, portanto, quanto menor o tempo de centrifuga, e maior o tempo de repouso, mais rápido as sementes se recuperavam de um possível estresse fisiológico causado pela hipergravidade. Resultados semelhantes foram encontrados por Santos et al. (10), com sementes de cenouras expostas em hipergravidade intermitente em 4, 11 e 18 dias, as quais apresentaram germinações maiores e superiores àquelas em gravidade terrestre (+1Gz). Da mesma forma, Russomano et al. (11), também encontraram resultados significativos no aumento da germinação com *Rúcula sativa* Mill, sugerindo que o hormônio vegetal auxina pode responder ao estímulo da hipergravidade influenciando o crescimento das plantas. As auxinas são caracterizadas pela sua capacidade de induzir o alongamento de células na região subapicais de ramos. Além disso, ela afeta os processos fisiológicos, incluindo fototropismo, geotropismo, o desenvolvimento dos frutos e o gênero de expressão.

Observando os dados obtidos nessa pesquisa foi verificado que o grupo centrífuga 2 apresentou um número de flores e massa em folhas muito superior ao grupo controle 2, o que poderia corroborar com a teoria de Russomano et al. (11). Já o mesmo não se repetiu com os controles 1 a centrífuga 1. Durante o plantio a céu aberto, as plantações da centrífuga 1 e controle 1 sofreram ação de rajadas de vento, fazendo com que a sua cobertura de proteção fosse afetada, o que não aconteceu com os grupos centrífuga 2 e controle 2. Nesse sentido, apesar da tentativa de padronizar as condições experimentais, este evento pode ter afetado o desenvolvimento dos grupos 1. Assim, para confirmar os efeitos da hipergravidade simulada sobre o cultivo do manjericão, faz-se necessária a quantificação da auxina como uma próxima etapa experimental.

Adicionalmente, estudos realizados por Aubay-Centiset et al. (4), mostraram que sementes de *Arabidopsis thaliana* suportaram a hipergravidade simulada de +5Gz, realizada no escuro, por 30 minutos, em 6 dias. Segundo os autores, mudanças nas forças gravitacionais afetam as atividades das células vegetais, e, entre elas, a expressão gênica, que pode ser modulada muito rapidamente. Os autores confirmam, ainda, que as alterações na expressão dos genes em resposta a variações na força gravitacional não são um processo isolado e envolve genes ligados à parede celular, ao citoesqueleto e às auxinas. Além disso, os padrões distintos de expressão nos permitem discriminar entre diferentes "classes de genes", alguns dos quais são dependentes da sequência de alterações em forças gravitacionais. Nesse sentido, a avaliação de expressão gênica torna-se um fator fundamental no seguimento desta pesquisa.

Nesse estudo, o eugenol foi o principal composto encontrado, possivelmente, devido à época da colheita, que foi realizada entre a 14<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> semana após o plantio. Experimentos realizados por Labra et al. (16) e Huang et al. (31) demonstraram que o composto majoritário encontrado no manjericão do tipo italiano (cv. Genovês, italiano

folha grande, etc) foi o linalol e o segundo maior composto foi o eugenol. De acordo com os autores, a extração das folhas frescas deve ser feita da 3ª semana a 5ª semana após o plantio, ou seja, nesse estágio, o manjeriço é jovem e pequeno (medindo de 8 a 12 cm), possui pouca ou nenhuma ramificação em seu caule principal e as folhas ainda são jovens e não estão maduras; mas, em contrapartida, os rendimentos dos óleos essenciais costumam ser baixos independentemente da quantidade de folhas frescas usadas para a extração. Huang et al. (31) em seus estudos encontrou para *O. basilicum* cv. Italiano folha grande a quantidade de linalol e eugenol, 54% e 30% respectivamente. Labra et al. (16) avaliando o polimorfismo genético em cultivares de *O. basilicum*, observou uma baixa ou mesmo nenhuma variabilidade genética, devido à reprodução e à propagação autógama. Os autores também realizaram um estudo taxonômico genético para classificar os cultivares, pois cultivares de *O. basilicum* podem ter características agronômicas muito semelhantes, como, por exemplos, os cultivares genovês e italiano de folha grande, que possuem mesmo aroma, quimiotipos majoritários (linalol e eugenol), mesmo tamanho e flor (branca), só diferenciando fisicamente pelas folhas, sendo um do tipo ovalado e verde escuro (genovês). O autor extraiu os óleos essenciais depois de 90 dias, identificando linalol de 19% a 37% e eugenol de 28% a 30%, como componentes majoritários. Esses dados corroboram os achados do presente estudo, pois em tempo de coleta e extração semelhante foi encontrado um percentual de linalol de 22% a 28% e eugenol de 47% a 62%, a exceção de o eugenol, aqui encontrado como sendo muito superior.

O eugenol foi o componente predominante, possivelmente, devido às condições edafo-ambientais e de sua biossíntese. A biossíntese de componentes e produção de óleos essenciais ocorre nos tricomas glandulares presentes na superfície das folhas do manjeriço. Com a maturação e a idade avançada da folha, há uma

diminuição no número de tricomas glandulares ao mesmo tempo em que as folhas ganham peso. Geralmente uma folha jovem posicionada no alto do caule principal contém rendimento de óleo essencial mais baixo que uma folha velha posicionada abaixo do caule principal; entretanto, a mesma folha jovem, com menor peso, possui maior concentração de óleos essenciais que uma folha velha. Isso ocorre porque a concentração de óleos essenciais decresce, por evaporação, conforme a maturação da folha em tamanho, peso e idade, a concentração decresce (32).

Na biossíntese, os compostos, em sua maioria são derivados uns dos outros. Metileugenol e metilchavicol são produtos metilados de eugenol e chavicol, respectivamente. Essa conversão acontece com as enzimas eugenol-O-metiltransferase (MT) e chavicol-O-metiltransferase (COMT), respectivamente. O nível de atividade dessas enzimas na diferença de quimiotipos é um dos grandes fatores que afetam a distinção da composição de fenilprofenos, nos óleos essenciais de manjeriço (32). Fischer et al. (32), em seus estudos sobre as folhas de manjeriço, explica que esse processo de conversão não é tão simples e difere muito de uma folha para outra, e que, muitas vezes, não acontece essa conversão e, assim, são mantidas altas as concentrações de eugenol. O autor demonstrou em seus estudos que a posição das folhas de manjeriço no caule principal não só afetam a composição de óleo essencial como também o processo de maturação das folhas difere muito uns dos outros. Ele, porém, não elucidou o porquê dessa diferença e determinou que fossem necessárias mais pesquisas para descobrir se isso pode ser causado por fatores hormonais e/ou ambientais.

Concluimos, assim, que a hipergravidade simulada afeta tanto a germinação quanto o crescimento do manjeriço quando realizada de forma intermitente por 1 e 2 dias, além de sugerir que essa exposição influencia de forma positiva no desenvolvimento da planta, face ao maior número de massa produzida, assim como de

flores. No entanto, a produção de óleos essenciais do manjeriçãõ não foi afetada, embora tenhamos observado que a produção de eugenol tenha sido superior, provavelmente devido a fatores ambientais e/ou hormonais. Estudos que avaliem a resposta da auxina e da expressão gênica à hipergravidade simulada podem ser importantes para melhor elucidar os efeitos do aumento gravitacional sobre o manjeriçãõ.

## 7. Referências Bibliográficas

1. Icon Group International, Inc. The 2013 Report on Herbal Supplements and Remedies: World Market Segmentation by City. **Paperback**, June 19, 2013.
2. BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. Plantas aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial. **Layer Studio Gráfico e Editora Ltda**, 2009 - 160 p.
3. PEREIRA, R. C. A; MOREIRA, A. L. M. Manjerição: cultivo e utilização. 31 p. (**Documentos/Embrapa Agroindústria Tropical**, ISSN 2179-8184, 136), 2011.
4. AUBAY-CENTIS, S.; GASSET, G.; MAZARS, C.; RANJEVA, R.; GRAZIANA, A. Changes in gravitational forces induce modifications of gene expression in *A. thaliana* seedlings. **Planta**. vol. 218, n.2, p. 179 – 185, 2003.
5. FITZELLE, K. J.; KISS, J. Z.; Restoration of gravitropic sensitivity in starch-deficient mutants of *Arabidopsis* by hypergravity. **Journal of Experimental Botany**. vol. 52, n. 355, p. 265 – 75, 2001.
6. KISS, J. Z.; EDELMAN, R. E.; WOOD, P .C. Gravitropism of hypocotyls of wild-type and starch-deficient *Arabidopsis* seedling in spaceflight studies. **Planta**, vol. 209, n. 1, p. 96 – 103, 1999.
7. SOGA, K. WAKABAYASHI, K.; KAMISAKA, S.; HOSON, T. Mechanoreceptors rather than sedimentable amyloplasts perceive the gravity signal in hypergravity-induced inhibition of root growth in azuki bean. **Functional Plant Biology**. vol. 32, n. 2, p. 175 – 179, 2005.
8. SOGA, K.; WAKABAYASHI, K.; KAMISAKA, S.; HOSON, T. Gravitropism in growth inhibition of plant shoots under hypergravity conditions produced by centrifugation is independent of that in gravitropism and may involve mechanoreceptors. **Planta**. vol.218, n. 6, p. 1054 – 1061, 2004.
9. SOGA, K. Perception mechanism of gravistimuli in gravity resistance responses of plants. **Biological Sciences in Space**. vol. 18, n. 3, p. 92 – 93, 2004.
10. SANTOS, M. A dos; FACHEL, F. N. S., NAVA, M. J. A.; ASTARITA, L. V.; COLLIN, P.; RUSSOMANO, T. Effect of hypergravity simulation on carrot germination and growth. **Aviation, space and environmental medicine**, vol. 83, n°10, october 2012.

11. RUSSOMANO, T.; RISSATTI, M. R.; COELHO, R. P.; SCOLARI, D.; SOUZA, D.; PRÁ-VELEDA, P. Effects of Simulated Hypergravity on Biomedical Experiments. **IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine**, 2007.
12. BARREIRO, A. P. Produção de biomassa, rendimento e composição de óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) em função de reguladores vegetais. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas - Botânica). Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2006.
13. LEONARDO, M. Produção de óleo essencial associado à deficiência hídrica em plantas de *Ocimum basilicum* L. cv. Grnovese. **Tese** (Doutorado em Agronomia, Área de concentração em irrigação e drenagem). Faculdade de Ciências Agrônômicas. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu, 2007.
14. SILVA, F. Óleo essencial e conservação pós-colheita de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) em dois horários e duas épocas de colheita. **Tese** (Pós-graduação em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2000.
15. MORAIS, T. P. S. Produção e composição do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) sob doses de cama de frango. **Dissertação** (Pós-Graduação em Agronomia em Fitotecnia). Faculdade de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2006.
16. LABRA, M.; MIELE, M.; LEDDA, B.; GRASSI, F.; MAZZEI, M.; SALA, F. Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. **Plant Science**. n. 167, p. 725 – 731, 2004
17. MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira** n. 27, 2009.
18. COSCOLIN, R. B. dos S. Efeitos fisiológicos e bioquímicos induzidos por deficiência hídrica em plantas de *Ocimum basilicum* L. **Dissertação** (Pós-Graduação em Irrigação e Drenagem). Faculdade de Ciências Agrônômicas. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu, 2012.
19. AMRANIA, S.; HARNAFIB, H.; GADIB, D.; MEKHFIB, H.; LEGSSYERB, A. AZIZ, M.; NIZARD, F. M.; BOSCA, L. Vasorelaxant and anti-platelet aggregation effects of aqueous *Ocimum basilicum* extract. **Journal of Ethnopharmacology**. n. 125, p. 157 – 162, 2009.

20. SHRI, R.; BORA, K. S.; ARORA, S. Role of *Ocimum basilicum* L. in prevention of ischemia and reperfusion-induced cerebral damage, and motor dysfunctions in mice brain. **Journal of Ethnopharmacology**. n. 137, p. 1360 – 1365, 2011.
21. NIEMEYER, E. D.; KWEE, E. M. Eileen M. Variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) **Cultivars**. **Food Chemistry**. n.128, p. 1044 – 1050, 2011.
22. TELCI, I.; BAYRAM, E.; YILMAZ, G.; AVC, B. Variability in essential oil composition of Turkish basils (*Ocimum basilicum* L.). **Biochemical Systematics and Ecology**. n. 34. p. 489 – 497, 2006.
23. DAMBOLENA, J. S.; ZUNINO, M. P.; LÓPEZ, A. G.; RUBINSTEIN, H. R.; ZYGADLO, J. A.; MWANGI, J. W.; THOITHI, G. N.; KIBWAGE, I. O.; MWALUKUMBI, J. M.; KARIUKI, S. T. Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, n. 11, p. 410 – 414, 2010.
24. VINCENT, C.; KÉITA, S. M.; SCHMITA, J. P.; ARNASON, J. T.; BÉLANGER, A. Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) [Coleoptera: Bruchidae]. **Journal of Stored Products Research**. n. 37 p. 339 – 349, 2001.
25. OPALCHENOVA, G.; OBRESHKOVAB, D. Comparative studies on the activity of basil—an essential oil from *Ocimum basilicum* L.— against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods. **Journal of Microbiological Methods**. n. 54, p. 105 – 110, 2003.
26. SANTOS, F. C. C. dos; VOGEL, F. S. F.; MONTEIRO, S. G. Efeito do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) sobre o carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em ensaios *in vitro*. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 33, n. 3, p. 1133 – 1140, 2012.
27. GOVINDARAJAN, M.; SIVAKUMAR, R.; RAJESWARY, M.; YOGALAKSHMI, K. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Ocimum basilicum* (L.) against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes*

- albopictus* and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae). **Experimental Parasitology**. vol. 134, p. 7 – 11, 2013.
28. MARRIOT, P.J.; SHELIE, R.; CORNWELL, C. Gas chromatographytechnologies for the analysis of essential oils. **Journal of Chromatography A**, v. 936, p. 1-22. 2001.
  29. ROSADO, L.D.; PINTO, J. E. B. P.;BOTREL, P. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.;ALVES, E. S. N. P. B.; Influence of leaf processing and type of drying on the content and chemicalcomposition of the essential oil of basil cv. Maria Bonita. **Ciências e agrotecnologia, Lavras**, v. 35, n. 2, p. 291-296, mar./abr., 2011.
  30. LIMA, M. L. de S; SOUZA, B. S. de; OLIVEIRA, A. M. de; TORRES, S. B. Effect of temperature and lighth on *Ocimum basilicum* L. seed germination. **Caatinga (Mossoró,Brazil)**, v.20, n.4, p.31-33, 2007.
  31. HUANG, Z.; WANG, B.; MORTLEY,D.G.; MINDINGALL, T.; BONSI, C.K.; HILL, W.A.; MORRIS, C.E. Chemical Characteristics of Essential Oil from Five Basil Cultivars Grown Hydroponically in a Controlled Environment Using the Nutrient Film Technique. **International Journal of Applied Science and Technology**.Vol. 1, No. 6; November 2011.
  32. FISCHER, R.; NITZAN, N.; DAVID, C.; RUBIN, B.; DUDAI, N. Variation in essential oil composition within individual leaves of sweet basil (*Ocimumbasilicum* L.) is more affected by leaf position than by leaf age. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2011, 59, 4913 – 4922.
  33. ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography mass spectrometry. **4º edition. Illinois: Allure**. 804p. 2007.