



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
FACULDADE DE FARMÁCIA

**Análise química e da atividade antimicrobiana dos óleos
essenciais de *Ocimum selloi* Benth, *Hesperozygis myrtoides* (A.
St.-Hil.) Epling e *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae)**

MARCIA GUIMARÃES MARTINI

Rio de Janeiro

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

FACULDADE DE FARMÁCIA

Departamento de Produtos Naturais e Alimentos
Laboratório de Fitoquímica e Farmacognosia



MARCIA GUIMARÃES MARTINI

Análise Química e da Atividade Antimicrobiana do Óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth, *Hesperozygis myrtoides* Epling e *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadores: Prof^a Dr^a. Suzana Guimarães Leitão
Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira

Rio de Janeiro, julho de 2011

FICHA CATALOGRÁFICA

M386a Martini, Marcia Guimarães.

Análise química e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth, *Hesperozygis myrtooides* Epling e *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae)/ Marcia Guimarães Martini; orientador Suzana Guimarães Leitão e Davyson de Lima Moreira. – Rio de Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2011.

74f. : il. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Lamiaceae. 2. *Ocimum*. 3. *Hesperozygis*. 4. *Mentha*.
5. Óleos essenciais. 6. Atividade antimicrobiana. I. Leitão, Suzana Guimarães.
II. Moreira, Davyson de Lima. III. Título.

CDD 615.32

Marcia Guimarães Martini

Análise Química e da Atividade Antimicrobiana do Óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth, *Hesperozygis myrtoides* Epling e *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Aprovada em:

Prof^a. Dr^a. Suzana Guimarães Leitão (FF/UFRJ)
Orientadora

Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira (Farmanguinhos, FIOCRUZ,RJ)
Orientador

Prof^a. Dr^a. Maria Auxiliadora Coelho Kaplan (NPPN/UFRJ)

Prof. Dr. Daniel Weingart Barreto (EQ/UFRJ)

Prof^a. Dr^a. Lúcia Maria Jaeger de Carvalho (FF/UFRJ)

Dedico este trabalho aos meus pais que são os meus melhores exemplos e sustentáculos da minha Vida.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter me dado a Vida e a oportunidade de recomeçar todos os dias.

Aos meus pais pelos ensinamentos, pelo fortalecimento, pela amizade, pelo carinho, pelos exemplos de amor ao próximo e à Vida e pelo amor incondicional.

Ao meu irmão, minha cunhada e meus sobrinhos Débora e Vinícius que me apoiaram na minha nova caminhada.

À minha madrinha Sandra pelo carinho, pela amizade, pelos conselhos e pelo apoio recebido no momento de mudanças para minha nova caminhada.

À minha tia Zélia pelas conversas, pelas comidas boas, pelo carinho e amizade recebidos.

Aos meus primos Dani, Pedro, Rinaldo e Rinaldinho pelo carinho e amizade recebidos.

À minha orientadora Suzana por ter me dado esta oportunidade de ser Mestre, pelo seu carinho, pela sua dedicação e pelo seu exemplo de profissional.

Ao meu orientador e amigo Davyson quem me ajudou muito, me incentivou a fazer o mestrado, pela sua dedicação, pelo exemplo de profissional, pela amizade.

Ao programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos professores componentes da banca, Prof^a Dr^a. Maria Auxiliadora Coelho Kaplan, Prof. Dr. Daniel Weingart Barreto, Prof^a Dr^a Lúcia Maria Jaeger de Carvalho, Prof^a Dr^a. Gisela Maria Dellamora Ortiz e Prof^a. Dr^a. Aline Castellar Duarte, por terem aceito meu convite.

Às professoras da banca de acompanhamento Prof^a. Dr^a. Nancy dos Santos Barbi e Prof^a Dr^a. Elisabete Pereira dos Santos pela dedicação e ajuda na correção da minha dissertação.

Ao Prof. Dr. Danilo Ribeiro de Oliviera, à Prof^a Dr^a. Priscilla Vanessa Finotelli e Prof^a Dr^a Gilda Guimarães Leitão pela amizade e carinho.

À Prof^a Maria Auxiliadora Coelho Kaplan pelo exemplo de mestre, de capacidade, de firmeza, de sabedoria, de dedicação e pelo carinho demonstrado a todos os alunos.

Às professoras Dr^a Elisabete Pereira dos Santos e Rita de Cássia Ascensão Barros pela oportunidade de ajudá-las nas aulas de tecnologia cosmética.

Aos meus colegas de laboratórios: João Paulo, Mariana, Fernanda, Aline, Shaft, Alex, Narjara, Priscila, Natália, Letícia e Paula pela amizade e pelos bons momentos que passamos juntos.

Ao Dr. Humberto Bizzo, Prof^a Dr^a. Celuta S. Alviano, Prof^a Dr^a. Daniela S. Alviano e Prof Dr. Paulo Murillo Neufeld pela colaboração nos testes realizados, que possamos fortalecer ainda mais esta brilhante colaboração.

Aos funcionários da Embrapa, farmacêutica Marcelly, farmacêutico Marcos e a química Andrezza pela ajuda e colaboração nas análises químicas.

Ao Dr. Daniel Barreto Weingart Barreto e Adriana Seara pela compreensão dos meus momentos dedicados ao mestrado e pela amizade.

A todos meus familiares e amigos que torceram por mim.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."
Bertolt Brecht.*

Resumo

MARTINI, Marcia Guimarães. **Análise química e da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Ocimum selloi* Benth, *Hesperozygis myrtoides* (A. St.-Hil.) Epling e *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae).** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

A família Lamiaceae possui aproximadamente 220 gêneros e cerca de 3.500 a 4.000 espécies. Espécies dessa família são conhecidas por serem bastante aromáticas e, por isso, são usadas em culinária. *Ocimum selloi* Benth é uma planta nativa do Brasil, usada na medicina tradicional e vendida em feiras-livres no Estado do Rio de Janeiro. *Hesperozygis myrtoides* (A. St.-Hil.) Epling é um pequeno arbusto muito aromático encontrado no Estado de Minas Gerais e que cresce em altitudes de 1800 metros. *Mentha pulegium* L. é originária da Região Mediterrânea e parte da Ásia, apresentando um aroma agradável de “menta” e um importante polimorfismo químico. O objetivo deste trabalho foi analisar os constituintes voláteis de diferentes indivíduos de *O. selloi*, *H. myrtoides* e *M. pulegium* e correlacionar a composição volátil com possíveis quimiotipos, além de avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e realizar estudo de estabilidade acelerado. *O. selloi* foi adquirido de feiras-livres, enquanto que a *M. pulegium* foi adquirida de um produtor de ervas na cidade de Tombos/ MG, já o *H. myrtoides* foi coletado no topo da montanha em volta da cidade de Aiuruoca/ MG. Os óleos essenciais destas espécies foram extraídos por hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado e analisados por CG-DIC e CG-EM. Os ensaios antimicrobianos foram feitos por *drop test* e o MIC contra cepas de bactérias *Gram* positivas e negativas. Foi feito também MIC para cepas clínicas de *Candida*. O teste de estabilidade acelerado foi realizado em câmara climática, segundo protocolos da ANVISA (2005). A substância metilchavicol foi identificada como a majoritária em todos os óleos essenciais de *O. selloi*, variando de 92,7% a 97,6%. Os constituintes majoritários do óleo essencial de *H. myrtoides* foram identificados como a pulegona (44,4%) e a isomentona (32,7%). O óleo essencial de *M. pulegium* mostrou como constituintes majoritários a isomentona (33,6%) e a pulegona (32,8%). Todos os óleos essenciais apresentaram atividade antimicrobiana para os microorganismos testados, sendo as cepas clínicas de *Candida albicans* e *glabrata* as mais susceptíveis. Combinação em diferentes proporções dos óleos essenciais de *O. selloi* e *H. myrtoides* foram testados para verificar sua atividade antimicrobiana contra *C. albicans*, entretanto, não houve modificação da atividade, nas concentrações testadas. O resultado do teste de estabilidade acelerado mostrou que os óleos essenciais de *O. selloi* e *H. myrtoides* mostraram-se estáveis, mesmo tendo a sua coloração modificada, pois os constituintes majoritários do óleo essencial de *O. selloi* (metilchavicol) e de *H. myrtoides* (pulegona e isomentona) tiveram pouca variação no teor durante os seis meses de estudo. Portanto, os óleos essenciais dessas espécies poderão ser empregados em formulações farmacêuticas que visam o tratamento de infecções causadas por *Candida*.

Palavras chaves: Lamiaceae, *Ocimum*, *Hesperozygis*, *Mentha*, óleos essenciais, atividade antimicrobiana

Abstract

MARTINI, Marcia Guimarães. **Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from *Ocimum selloi* Benth, *Hesperozygis myrtooides* (A. St.-Hil.) Epling (Lamiaceae).** Dissertation (Master in Pharmaceutical Sciences). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

The family Lamiaceae has approximately 220 classes and about 3,500 to 4,000 species. Species of this family are known to be very aromatic and therefore are used in cooking. *Ocimum selloi* Benth is a Brazilian native plant, used in traditional medicine and sold in open-air markets in the State of Rio de Janeiro. *Hesperozygis myrtooides* (A. St.-Hil.) Epling is a very aromatic shrub found in the State of Minas Gerais, which grows at altitudes of 1800 meters. *Mentha pulegium* L. originates in the Mediterranean region and parts of Asia, with a pleasant aroma of "mint" and an important chemical polymorphism. The objective of this study was to analyze the volatile constituents from different individuals of *O. selloi*, *H. myrtooides* and *M. pulegium* volatile composition to correlate a volatile composition with possible chemotypes, as well as evaluating the antimicrobial activity of essential oils and perform accelerated stability study. *O. selloi* was purchased from open-air markets, while the *M. pulegium* was purchased from an herbal producer of the city of Tombos/ MG. The *H. myrtooides* was collected in the top of mountains around the city of Aiuruoca/ MG. The essential oils of these species were extracted by hydrodistillation in modified Clevenger apparatus and analyzed by GC-FID and GC-MS. The antimicrobial tests were made by "drop test" and the MIC against strains of Gram positive and negative bacteria. MIC was also done for clinical strains. The accelerated stability test was conducted in a climatic chamber, according to the ANVISA protocols (2005). The Metilchavicol substance was identified as the predominant in all the oils of *O. selloi*, ranging from 92.7% to 97.6%. The major constituents of the essential oil of *H. Myrtooides* were identified as pulegone (44.4%)

and isomenthone (32.7%). The essential oil of *M. pulegium* showed isomenthone (33.6%) and pulegone (32.8%) as the predominant constituents. All essential oils showed antimicrobial activity for the microorganisms tested, and the clinical strains of *Candida albicans* and *glabrata* were the most susceptible. Combination in different proportions of the essential oils of *O. selloi* and *H. myrtooides* were tested for their antimicrobial activity against *C. albicans*, however, there was no change in activity at the concentrations tested. The result of the accelerated stability test showed that the essential oils of *O. selloi* and *H. myrtooides* were stable, even though their color changed, as the major constituents of the essential oil of *O. selloi* (metilchavicol) and *H. myrtooides* (pulegone and isomenthone) had little variation in content during the six-month study. Therefore, the essential oils of these species may be employed in pharmaceutical formulations aimed to treat infections caused by *Candida*.

Key-words: Lamiaceae, *Ocimum*, *Hesperozygis*, *Mentha*, essential oils, antimicrobial activity

Sumário

	Pág.
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Família Lamiaceae	1
1.2 Gêneros estudados	3
1.2.1 <i>Ocimum</i> Benth	3
1.2.2 <i>Hesperozygis</i> Epling	7
1.2.3 <i>Mentha</i> L.	8
1.3 Óleos essenciais	12
1.3.1 Terpenos	14
1.3.1.1 Monoterpenos	15
1.3.2 Sesquiterpenóides	17
1.3.3 Arilpropanóides	18
1.4 Candidíase e atividade antimicrobiana de Óleos Voláteis	19
1.4.1 <i>Candida</i>	19
1.4.2 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3 METODOLOGIA	23
3.1 Material vegetal	23
3.2 Extração e análises do óleo essencial	23
3.3 Testes da atividade antimicrobiana	25
3.3.1 Teste de difusão em Agar (<i>Drop Test</i>)	25

3.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	26
3. 4 Teste de estabilidade acelerado	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 Teor e análise dos óleos essenciais de <i>O. selloi</i> , <i>H. myrtoides</i> e <i>M. pulegium</i>	28
4.1.1 <i>O. selloi</i>	28
4.1.2 <i>H. myrtoides</i>	35
4.1.3 <i>M. pulegium</i>	38
4.2 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de <i>O. selloi</i> , <i>H. myrtoides</i> e <i>M. pulegium</i>	42
4.3 Teste de estabilidade acelerado	46
4.3.1 <i>O. selloi</i> : Análises cromatográficas	46
4.3.2 <i>H. myrtoides</i> : análises cromatográficas	52
4.3.3 Características organolépticas dos óleos essenciais	57
5 CONCLUSÕES	58
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
7 ANEXOS	67

Listas de Figuras e Gráficos

	Pág.
Figura 1 - <i>Lavandula angustifolia</i> L	3
Figura 2 - <i>Origanum majorana</i> L.	3
Figura 3 - <i>Melissa officinalis</i> L.	3
Figura 4 - <i>Lavanda latifolia</i> L.	3
Figura 5 - <i>Ocimum selloi</i> Benth. (Lamiaceae)	4
Figura 6 - Fórmula estrutural do metilchavicol (a), do metileugenol (b) e do <i>trans</i> -anetol (c)	5
Figura 7 - <i>H. myrtoides</i> : planta em seu habitat nativo	7
Figura 8 - Fórmula estrutural da isomentona (a), mentona (b) e pulegona (c)	8
Figura 9 - <i>Mentha pulegium</i>	9
Figura 10 – Fórmula estrutural da pulegona (a), isopulegol (b) e isomentona (c)	10
Figura 11 - Biossíntese do ácido mevalônico e dos pirofosfatos de isopentenila e γ,γ -dimetilalila	15
Figura 12 – Esquema biossintético de formação do precursor dos monoterpenos (PPG)	16
Figura 13- Esquema biossintético de formação do precursor dos sesquiterpenos (PPF)	17
Figura 14 - Esquema biossintético de formação de ácidos cinâmicos	18
Figura 15 - Microscopia eletrônica mostrando uma colônia de <i>C. albicans</i>	19
Figura 16 - Aparelho de Clevenger Modificado	24
Figura 17- Câmara de Estabilidade	27
Figura 18 - Cromatograma do óleo essencial do <i>O. selloi</i> . (amostra de Madureira – Março 2010)	30
Figura19 – Cromatograma do óleo essencial de <i>H. myrtoides</i> - amostra de Abril 2010	37

Figura 20 – Cromatograma do óleo essencial de <i>M. pulegium</i>	40
Figura 21 – Proposta de formação de substâncias por isomerização e oxidação no óleo essencial de <i>O. selloi</i>	47
Figura 22- Cromatograma do óleo essencial de <i>O. selloi</i> -1ª análise do teste de estabilidade acelerado	50
Figura 23- Cromatograma do óleo essencial de <i>O. selloi</i> - 2ª análise do teste de estabilidade acelerado	51
Figura 24 – Proposta de oxidação do limoneno	52
Figura 25 – Cromatograma do óleo essencial de <i>H. myrtoides</i> – 1ª análise do teste de estabilidade acelerado	55
Figura 26 - Cromatograma do óleo essencial de <i>H. myrtoides</i> – 2ª análise do teste de estabilidade acelerado	56
Figura 27 – Fotos dos frascos contendo os óleos de <i>O. selloi</i> e <i>H. myrtoides</i> submetidos ao teste de estabilidade acelerado	57
Gráfico 1 – Variação das substâncias do óleo essencial de <i>O. selloi</i> : teste de estabilidade acelerado.	49
Gráfico 2 - Variação das substâncias do óleo essencial de <i>H. myrtoides</i> : teste de estabilidade acelerado	54

Lista de Tabelas

	Pág.
Tabela 1 – Atividade antimicrobiana (<i>drop test</i>) de óleos essenciais de <i>O. selloi</i> (Ponta Grossa/ PR), expressos como média de halo de inibição (mm)	5
Tabela 2 – Comparação da composição química dos óleos essenciais de <i>O. selloi</i> descritos na literatura (Viçosa, Lavras, Botucatu, Ponta Grossa)	6
Tabela 3 - Composição química dos óleos essenciais de <i>M. pulegium</i> descritos na literatura (Montividéu, Lisboa e Teerã)	11
Tabela 4 – Aquisição das plantas para obtenção do óleo essencial	24
Tabela 5 – Teor percentual dos óleos essenciais extraídos das folhas do <i>O. selloi</i>	29
Tabela 6 – Substâncias identificadas nos óleos essenciais de <i>O. selloi</i>	33
Tabela 7 – Comparação da composição química dos óleos essenciais em estudo com aqueles da literatura (Viçosa, Lavras, Botucatu, Ponta Grossa)	34
Tabela 8 – Teor percentual dos óleos essenciais extraídos das folhas do <i>H. myrtoides</i>	35
Tabela 9 - Substâncias identificadas na análise do óleo de <i>H. myrtoides</i>	36
Tabela 10 - Composição química identificada no óleo essencial das folhas de <i>M. pulegium</i>	38
Tabela 11- Comparação da composição química dos óleos essenciais de <i>M. pulegium</i> em estudo com aqueles da literatura (Uruguai, Lisboa e Teerã)	39
Tabela 12 - Comparação da composição volátil de <i>H. myrtoides</i> e <i>M. pulegium</i>	41
Tabela 13- Atividade antimicrobiana (<i>drop test</i>) do óleo essencial de <i>O. selloi</i>	43
Tabela 14 – Atividade antimicrobiana (<i>drop test</i>) do óleo essencial de <i>H. myrtoides</i> e da Associação dos óleos de <i>O. selloi</i> e <i>H. myrtoides</i>	43
Tabela 15- CIM dos óleos essenciais de <i>O. selloi</i> e <i>H. myrtoides</i>	44
Tabela 16- CIM dos óleos essenciais de <i>O. selloi</i> , <i>H. myrtoides</i> e <i>M. pulegium</i> contra cepas clínicas de <i>Candida</i>	45
Tabela 17 - Tabela das análises do teste de estabilidade acelerado do óleo de <i>O. selloi</i>	48
Tabela 18- Tabela das análises do teste de estabilidade acelerado do óleo de <i>H. myrtoides</i>	53

Lista de Siglas e Abreviaturas

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG-EM	Cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
DIC	Detector por ionização em chama
IRK	Índice de Retenção de Kovats
CIM	Concentração inibitória mínima
PPG	Pirofosfato de geranila
PPI	Pirofosfato de isopentenila
PPDMA	Pirofosfato de γ,γ -dimetilalila
SNC	Sistema nervoso central

1 Introdução

1.1 Família Lamiaceae

A família Lamiaceae possui aproximadamente 220 gêneros e cerca de 3.500 a 4.000 espécies (AGOSTINI *et al.*, 2009). Essa família conta com espécies de porte herbáceo, arbustivo ou subarbustivo, podendo ser anual ou perene, com folhas simples ou compostas cruzadas ou opostas, as quais podem ser sésseis ou pecioladas. As flores são bilabiadas, de diferentes tamanhos, sozinhas ou juntas em um denso terminal ou inflorescências axilares e muito aromáticas (AGOSTINI *et al.*, 2009). Crescem em vários habitats e altitudes: da região Ártica ao Himalaia, sudeste da Ásia ao Havaí, Austrália, África e do Norte ao Sul do Novo Mundo. Apresenta-se como uma família típica de Cerrado, as quais habitam as regiões mais quentes do mundo (ALMEIDA e ALBUQUERQUE, 2002).

Essa família é rica em espécies produtoras de óleo essencial e, este acúmulo é devido à presença de estruturas altamente especializadas chamadas tricomas glandulares. Os óleos essenciais de mais de trinta espécies dessa família têm sido usados comercialmente há mais de sete décadas. Dentre esses pode-se citar: *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus zygis* L., *Hyssopus officinalis* L., *Salvia officinalis* L. (HARLEY e REYNOLDS, 1992).

Muitos gêneros da família Lamiaceae são cultivados como plantas ornamentais por todo o mundo, destacando-se: *Lavandula* L., *Mentha* L., *Molucella* L., *Nepeta* L., *Perovskia* Kar., *Phlomis* L., *Plectranthus*, *Stachys* L., *Teucrium* L. e *Thymus*. Membros da família são muito usados como ervas aromáticas e como condimentos. Como exemplo, o sabor especial do tempero “orégano” conhecido no mundo todo é dado por vários gêneros da família Lamiaceae: *Coleus* Lour., *Hedeoma* Pers., *Hyptis* Jacq., *Monarda* L., *Ocimum* L., *Origanum* L., *Poliomintha* A. Gray e *Salvia* L. (HARLEY e REYNOLDS, 1992).

Essa família tem uso na medicina popular, sendo que muitas de suas espécies são usadas no tratamento de tumores, inchaços, dermatites, irritações de pele, cólicas, e usados como antiparasitários, antimicrobianos, entre outros (HARLEY e REYNOLDS, 1992), além de serem empregadas como aromáticas nas indústrias de cosméticos, alimentos, produtos de higiene e perfumaria (AGOSTINI *et al.*, 2009).

Cita-se como exemplo o gênero *Lavandula* L.: os óleos essenciais das espécies *L. angustifolia* (Fig. 1) e *L. latifolia* L.(Fig. 4) misturados com outros óleos essenciais são usados na fabricação de fragrâncias para perfumes. Na Itália, as flores de *L. angustifolia* L.(Fig. 1) são empregadas para aliviar os sintomas do reumatismo e quando em infusão, para o tratamento de inflamação, asma e laringites. Folhas e flores frescas de *L. dentata* são usadas na Arábia Saudita sobre a testa para aliviar dores de cabeça. No Marrocos, a espécie *L. dentata* é usada para o tratamento de retenção urinária e para remover pedras nos rins e ureter. O óleo essencial de *L. lanata* Boiss é usado para repelir insetos. O óleo essencial de *L. latifolia* L. (Fig. 4) é usado em sabonetes, sais de banho e em *spray* para aromatizar o ambiente. A espécie *Melissa officinalis* L (Fig.3) é usada para desordens cardíacas na Turquia e, na Itália, é usada em compressas embebidas com a infusão das flores para aliviar a rigidez da nuca. No gênero *Origanum* L. destacam-se as espécies *O. compactum* Benth, que no Norte da África tem fama de ter propriedades afrodisíacas, e *O. majorana* L. (Fig. 2) que é usada como tempero na culinária na Arábia Saudita e na Turquia é usada para tratamento de espasmos do coração. Na Itália, as inflorescências são usadas como sedativo, digestivo e antineurálgico. Em Israel, folhas de *O. syriacum* L. são usadas para aliviar dores de dentes. As folhas secas de orégano, *O. vulgare* L., são muito usadas na Itália para o tratamento de desordens na pele (HARLEY e REYNOLDS, 1992).

Segundo levantamento bibliográfico, o uso medicinal dessa família está relacionado com os terpenóides, em especial aqueles encontrados nos óleos voláteis (AGOSTINI *et al.*, 2009, HARLEY e REYNOLDS, 1992). Os metabólitos especiais mais abundantes dessa família são terpenóides (mono, sesqui, di e triterpenos) e flavonóides (AGOSTINI *et al.*, 2009).



Figura 1 - *Lavandula angustifolia* L.

Fonte: <http://www.crocus.co.uk/images/products2>



Figura 2 - *Origanum majorana* L.

Fonte: <http://sites.google.com/site/florasbs/lamiaceae/manjerona>



Figura 3 - *Melissa officinalis* L.

Fonte: <http://www.naturallynutritioninc.com>



Figura 4 - *Lavanda latifolia* L.

Fonte: <http://luirig.altervista.org/flora/lavandula.htm>

1.2 Gêneros Estudados

1.2.1 *Ocimum* Benth

O gênero *Ocimum* Benth (Lamiaceae) contém cerca de 160 espécies, nativas dos trópicos e subtropicais, algumas também encontradas em regiões temperadas. No Brasil, as espécies são encontradas nas regiões Sul e Sudeste (COSTA *et al.*, 2007). Algumas espécies são ricas em óleo essencial e têm sido empregadas comercialmente em produtos farmacêuticos, alimentos, flavorizantes e na indústria de perfumes (MARTINS *et al.*, 1996). Diversas espécies desse gênero são usadas

por leigos como condimentos em culinária, na medicina, e para controle de insetos (MORAES *et al.*, 2002).

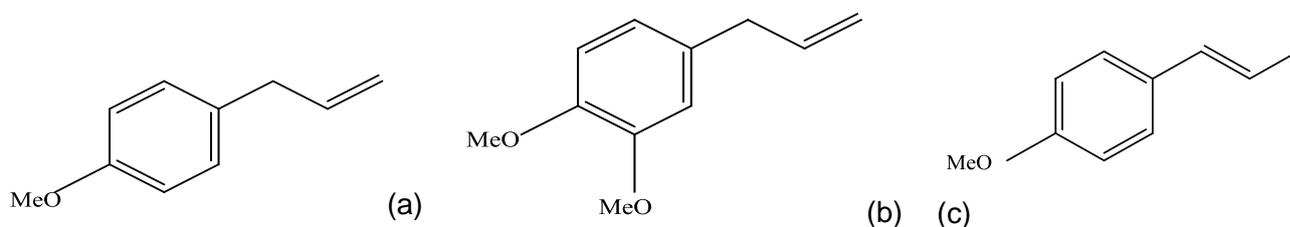
Dentre as espécies que são ricas em óleo essencial, destaca-se *O. selloi* (Fig. 5). Essa espécie é uma planta nativa do Brasil, encontrada nas regiões do Sul e do Sudeste. É um subarbusto perene, ereto, ramificado, de 40-80 cm de altura. Suas flores são pequenas, de cor branca, dispostas em racemos terminais curtos (PEREIRA *et al.*, 2009). Plantas de *O. selloi* podem ser encontradas tanto em locais sombreados como em locais abertos (GONÇALVES *et al.*, 2003). Essa espécie é conhecida popularmente como “elixir-paregórico” nos Estados da Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro; como “alfavaquinha” ou “anis” em Minas Gerais, e como “atroveran”, em São Paulo (COSTA *et al.*, 2007). Pode ser encontrada em estado silvestre ou cultivada em hortas e quintais, sendo utilizada popularmente como antidiarréico, antiespasmódico e antiinflamatório (COSTA *et al.*, 2008), além de ter comprovada atividade como repelente de insetos (COSTA *et al.*, 2007).



Figura 5 – *Ocimum selloi* Benth. (Lamiaceae)
Fonte: <http://dec.fq.edu.uy/wwds2008/fitoterapia/especies.htm>

Essa espécie apresenta indivíduos com odor semelhante aos frutos de “anis” (*Pimpinella anisum*) e “funcho” (*Foeniculum vulgare*) (MORAES *et al.*, 2001) e aqueles sem o odor de “anis”. Sabe-se que o teor de óleo volátil depende de vários fatores como época e local de cultivo, colheita, além do método de extração utilizando folhas frescas e outros solventes orgânicos (COSTA *et al.*, 2007). A nutrição da planta também é um fator de estresse importante, pois o excesso ou a deficiência de nutrientes pode interferir na produção de biomassa e na quantidade do princípio ativo (COSTA *et al.*, 2008).

Estudos da composição química do óleo essencial de *O. selloi* têm mostrado variações dos constituintes majoritários, sendo esses metilchavicol (Fig. 6a), metileugenol (Fig. 6b) ou *trans*-anetol (Fig. 6c), o que sugere a existência de quimiotipos (COSTA *et al.*, 2007) (Tabela 2).



Figuras 6 - Fórmula estrutural do metilchavicol (a), metileugenol (b) e *trans*-anetol (c)

Análises de óleos essenciais de amostras de *O. selloi* coletadas na cidade de Ponta Grossa/PR mostraram frações ricas em metilchavicol e eugenol. Esses óleos foram testados em cepas de *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. Os óleos testados revelaram atividade antimicrobiana discreta contra *E. coli* e *S. aureus* (halo de inibição médio de 9,0 mm), e total ausência de atividade contra cepas de *P. aeruginosa* (FARAGO *et al.*, 2004) (Tabela 1).

Tabela 1 – Atividade antimicrobiana (*drop test*) de óleos essenciais de *O. selloi* (Ponta Grossa/ PR), expressos como média de halo de inibição (mm)

Microorganismos	<i>O. selloi</i> variedade rica em metilchavicol	<i>O. selloi</i> variedade rica em eugenol	Controle positivo (Cloranfenicol)
<i>S. aureus</i>	9,3	9,0	20,0
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	17,0
<i>E. coli</i>	9,3	9,0	18,0

FARAGO *et al.*, 2004.

Tabela 2 – Comparação da composição química (teor relativo %) dos óleos essenciais de *O. selloi* descritos na literatura (Viçosa, Lavras, Botucatu, Ponta Grossa)

Substância	Minas Gerais Viçosa ^{1,2} 1995		Minas Gerais Lavras ³	São Paulo Botucatu ⁴		Paraná Ponta Grossa ⁵ Jan/Fev 2005
	A	B		Junho 2000	Jan/2001	
metilchavicol	80,7	—	93,9	24,1	30,0	55,3
metileugenol	—	63,1	0,3	0,1	0,1	—
β-bisaboleno	1,1	2,7	0,1	—	—	—
germacreno B	4,6	11,9	—	—	—	—
biciclosesquifelandreno	4,6	7,8	—	—	—	—
bergamoteno	0,8	0,9	—	—	—	—
<i>trans</i> -cariofileno	4,3	6,8	—	0,8	1,8	—
espatulenol	—	—	0,9	—	—	—
óxido de cariofileno	—	—	0,9	—	—	—
<i>trans</i> -anetol	—	—	—	45,4	58,6	34,2
<i>cis</i> -anetol	—	—	—	3,9	3,0	3,9
germacreno D	—	—	—	4,2	0,9	—
β-selineno	—	—	—	4,1	0,9	—
cariofileno	—	—	—	—	—	2,1

A = plantas do acesso A; B = plantas do acesso B; ¹MARTINS *et al.*, 1997; ²MAIA *et al.*, 2007; ³COSTA *et al.*, 2007; ⁴MORAES *et al.*, 2001; ⁵PAULA *et al.*, 2007.

1.2.2 *Hesperozygis* Epling

O gênero *Hesperozygis* Epling (Lamiaceae) contém cerca de seis espécies, sendo cinco encontradas na região Sul e Sudeste do Brasil e uma restrita ao México, *Hesperozygis marifolia* Epling (CANTINO e SANDERS, 1986; FRACARO e ECHEVERRIGARAY, 2006). Dentre dessas espécies, destaca-se *Hesperozygis myrtoides* (A. St.-Hil.) Epling que é um pequeno arbusto bastante aromático (Fig. 7), denominado de “poejo” na região de Aiuruoca/ MG, por ter aroma peculiar de “menta”. Suas folhas são empregadas na forma de chá para o tratamento de problemas respiratórios e na elaboração de uma bebida artesanal que, segundo a tradição local, é preparada com as partes aéreas dessa planta em aguardente de cana. A mistura é enterrada no solo, ficando em infusão por um ano e só é retirada para o consumo (LEITÃO *et al.*, 2009).

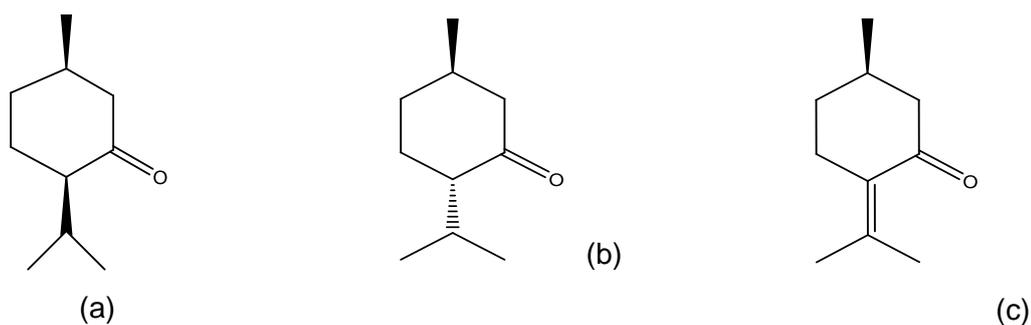


Figura 7 - *H. myrtoides*: planta em seu habitat nativo

Fonte: Coleção da Prof^a. Dr^a. Suzana G. Leitão

Estudo prévio realizado pelo grupo com *H. myrtoides* coletado em Aiuruoca/ MG, revelou como constituinte majoritário do óleo essencial a isomentona (Fig. 8a) e, em menor quantidade, a (+)-pulegona (LEITÃO *et al.*, 2009). Esse óleo essencial também foi testado para avaliação da atividade antimicrobiana frente a cepas clínicas de *Candidas* (*C. albicans*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*), além de três cepas de referência (*C. albicans* ATCC 90028, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. tropicalis* ATCC 750). Os resultados mostraram excelente atividade, com halo de inibição para todas as cepas, variando de 9,8 a 29,9 mm (LEITÃO *et al.*, 2009).

Estudos da composição volátil de espécies do gênero *Hesperozygis* Epling têm revelado frações ricas em monoterpenos. Por exemplo, a composição química do óleo essencial das espécies *H. ringens* e *H. rhododon*, coletadas na cidade de Caçapava do Sul/ RS, é rica em (+)-pulegona e mentona, respectivamente (Figs. 8b e 8c) (POSER *et al.*, 1996). Estudo realizado com o óleo essencial da espécie *H. marifolia* revelou a presença de isomentona e pulegona como constituintes majoritários (Figs. 8a e 8c) e, em menor quantidade, a mentona (Fig. 8b). Teste da atividade antimicrobiana frente a cepas de *Aspergillus flavus* com esse óleo essencial mostrou atividades fungistática e fungicida, na concentração de 1,0 mg/ml. Substâncias puras também foram testadas. A isomentona e a mentona não apresentaram atividade significativa, enquanto a pulegona inibiu o crescimento micelar (CHÁVEZ *et al.*, 2011; DURU *et al.*, 2004; ARRUDA *et al.*, 2006).



Figuras 8– Fórmula estrutural da isomentona (a), mentona (b) e pulegona (c)

1.2.3 *Mentha* L.

O gênero *Mentha* L. (Lamiaceae) contém cerca de 20 espécies, sendo originário da região Mediterrânea e parte da Ásia e está distribuído por quase todo o Mundo, especialmente, em regiões temperadas. As espécies desse gênero apresentam grande complexidade botânica sendo, por isso, de difícil identificação. Esta complexidade é devida à plasticidade morfológica, facilidade para hibridação, propagação vegetativa, cultivo desde a antiguidade e controvérsias de nomenclaturas (MARTINS e MARTINS, 2003). Análises das substâncias presentes nos óleos essenciais das espécies de *Mentha* permitem inferir sobre a existência de um importante polimorfismo químico, refletido nas muitas variedades e quimiotipos de espécies desse gênero, tendo sido descritos para *M. spicata*, *M. longifolia*, *M. suaveolens*, *M. diemenica* e *M. pulegium* (LORENZO *et al.*, 2002). Os óleos

essenciais de *Mentha* são utilizados em indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (MARTINS e MARTINS, 2003).

Os metabólitos principais do óleo essencial das espécies de *Mentha* são os monoterpenos cíclicos mentona, mentol e carvona, que conferem ao óleo essencial o aroma e sabor característico de menta (MARTINS e MARTINS, 2003).

Dentre as diversas espécies do gênero *Mentha* destaca-se *Mentha pulegium* L., conhecida também como “poejo” (Fig. 9). Essa espécie é nativa da Ásia e do Oriente Médio, foi introduzida no Brasil. Popularmente, o “poejo” é usado no tratamento de friagem, cólera, intoxicação alimentar, bronquite, tuberculose e, também, como antiflatulência, carminativo, expectorante, diurético, antitussígeno e para o tratamento de problemas menstruais (JAZANI *et al.*, 2009). O óleo essencial dessa planta contém uma complexa mistura de monoterpenos, alguns sesquiterpenos e outros constituintes voláteis (VASCO *et al.*, 1999).



Figura 9 - *Mentha pulegium*

Fonte: <http://obotanicoaprendiznaterradosespantos.blogspot.com/2009/07/plantas-aromaticas-poejo-mentha.html>

Estudo conduzido pelo Instituto Superior de Agronomia na cidade de Lisboa (Portugal) com o óleo essencial de *M. pulegium* revelou como constituinte majoritário a pulegona (Fig. 10a) e, em menor concentração, o isopulegol (Fig. 10b) (MARTINS *et al.*, 1998). Outro estudo realizado na cidade de Teerã (Irã) com *M. pulegium* revelou os constituintes pulegona (Fig. 10a) como majoritário e mentona em menor quantidade (AGHEL *et al.*, 2004). Partes aéreas floridas da *M. pulegium* e *M. rotundifolia*, coletadas no norte de Montevidéu (Uruguai), forneceram óleos

essenciais ricos em pulegona (Fig. 10a) e, em menor quantidade, isomentona (Fig. 10c) para *M. pulegium* (LORENZO *et al.*, 2002).

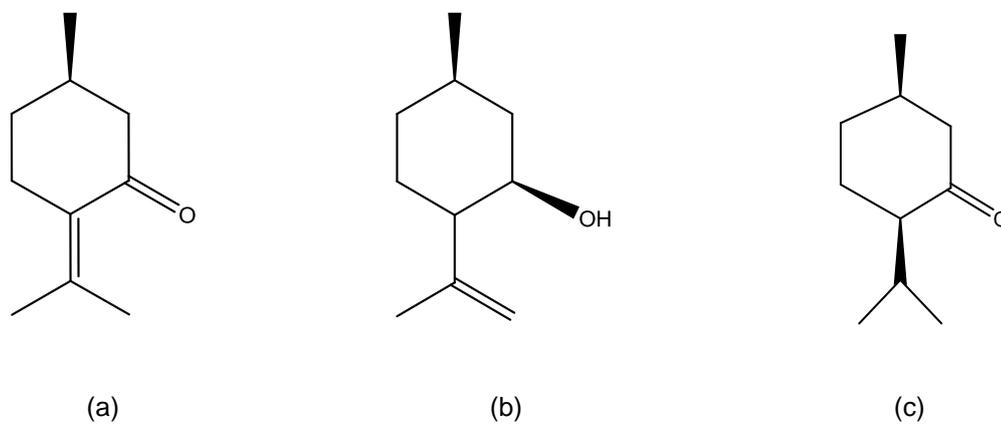


Figura 10 – Fórmula estrutural da pulegona (a), isopulegol (b) e isomentona (c)

Tabela 3 - Composição química dos óleos essenciais de *M. pulegium* descritos na literatura (Montevideu, Lisboa e Teerã)

Substâncias	Montevideu	Lisboa	Teerã
	Uruguai ¹	Portugal ²	Irã ³
α -tujano	-	0,2	-
α - pineno	0,5	0,3	-
sabineno	0,1	-	-
β -pineno	0,4	-	-
mirceno	0,3	0,8	-
3-octanol	1,5	-	0,8
limoneno	0,9	-	-
1,8-cineol	0,1	-	-
mentona	3,6	5,7	20,3
isomentona	10,9	0,2	-
mirtenol	-	0,3	-
neo-mentol	0,3	-	-
isopulegona	1,4	-	-
mentol	0,6	1,0	-
isomentol	0,1	-	-
neo-isomentol	0,8	-	-
α -terpineol	0,1	-	-
pulegona	73,4	39,5	37,8
1(7)- <i>p</i> -menta-2-one	-	-	4,9
carvona	-	-	0,2
acetato de 4-terpenila	-	-	1,0
carvacrol	-	-	0,3
piperitona	0,1	1,7	-
piperitenona	0,9	-	6,8
β -bourboneno	-	-	0,1
β -ioneno	-	-	0,4
calameneno	-	-	0,2
germacreno D	-	-	0,6
geraniol	-	0,4	-
isopulegol	-	17,3	-
acetato de geranil	-	0,2	-
anetol	-	0,3	-
<i>trans</i> -cariofileno	0,1	-	-
α -humuleno	0,9	-	-
β -cariofileno	-	1,7	-
óxido de cariofileno	0,3	-	1,3
viridiflorol	-	-	0,2

¹LORENZO *et al.*, 2002; ²MARTINS *et al.*, 1998; ³AGHEL *et al.*, 2004.

1.3 Óleos essenciais

Óleos essenciais são misturas complexas de substâncias orgânicas, provenientes do metabolismo especial das plantas. São constituídos, principalmente, por terpenos (mono e sesquiterpenos) e arilpropanóides (SMITH *et al.*, 2005; MORAIS, 2009; NERIO *et al.*, 2010; MAFFEI, 2010). Os óleos essenciais são responsáveis pelo característico odor das plantas, o qual contribui para diferenciá-las. Há aproximadamente 3000 óleos essenciais conhecidos e cerca de 10% têm importância comercial em indústria de cosméticos, perfumes, alimentos, farmacêutica, agrônômica, sanitários (BAKKALI *et al.*, 2008). Os óleos essenciais são obtidos por arraste com vapor d'água, hidrodestilação, expressão de pericarpo de frutos cítricos, *enfleurage*, extração por CO₂ supercrítico e por solventes orgânicos apolares (MORAIS, 2009; SMITH *et al.*, 2005). Os componentes voláteis podem ser satisfatoriamente analisados por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (ADAMS, 1995; MARRIOTT *et al.*, 2001). Os óleos voláteis também são conhecidos por óleos essenciais, óleos etéreos ou essências, com características tais como sabor ácido e picante e se recentemente extraídos são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados. Não são muitos estáveis, principalmente, na presença de ar, luz, calor, umidade e metais, sendo que a maioria dos óleos voláteis apresenta índice de refração e são opticamente ativos, característica esta muito importante no controle de qualidade dos mesmos. A localização dos óleos voláteis nas plantas depende da família vegetal. São encontrados em abundância em angiospermas dicotiledôneas, tais como, nas famílias Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Piperaceae, Rutaceae, entre outras. A ocorrência de quimiotipos é freqüente em plantas ricas em óleos voláteis (SIMÕES *et al.*, 2000). Alguns óleos essenciais podem conter de 20 a 60 constituintes com diferentes concentrações. Outros óleos são caracterizados por apresentarem dois ou três constituintes que são considerados componentes majoritários com elevadas concentrações (20-70%) (BAKKALI *et al.*, 2007). Sinergismo entre óleos essenciais também pode ocorrer, assim como antagonismo (HARRIS, 2003).

Dentre as principais funções biológicas atribuídas aos óleos essenciais, destaca-se: a inibição de germinação, ação repelente contra predadores, atração de

polinizadores, proteção quanto à perda de água e aumento de temperatura. Dentre as várias propriedades farmacológicas, pode-se citar ação carminativa, antiespasmódica, estimulante sobre secreção do aparelho digestivo, cardiovascular, irritante tópica ou revulsiva, secretolítica, sobre o SNC, anestésica local, antiinflamatória e antimicrobiana, dentre outras (SIMÕES *et al.*, 2000; BAKKALI *et al.*, 2008). Apresentam, também, citotoxicidade, porém, por serem formados de diversos constituintes, não apresentam um alvo celular específico (BAKKALI *et al.*, 2008). Uma vez que são formados por substâncias lipofílicas, atravessam a parede celular e a membrana citoplasmática e afetam as camadas polissacarídicas e a permeabilidade destas (BAKKALI *et al.*, 2008; SAAD, 2010). Os efeitos dessa citotoxicidade foram observados *in vitro* na maioria das bactérias patogênicas Gram positivas e Gram negativas pelo teste de difusão em Agar (semi-sólido), usando um disco de papel de filtro ou pelo método de diluição em meio líquido de caldo de culturas (BAKKALI *et al.*, 2008). Em geral, a citotoxicidade dos óleos essenciais é devido à presença de substâncias com grupos fenólicos, aldeídos e alcoóis (BAKKALI *et al.*, 2008; OMIDBEYGI, 2007). Essa citotoxicidade dos óleos essenciais é de grande importância no uso contra patógenos humano e animal, parasitas, e também para preservação de produtos da agricultura e marinhos. Os óleos essenciais ou alguns de seus componentes são eficazes contra um grande número de microorganismos tais como: bactérias, vírus, fungos, protozoários, parasitas, *Ascaris*, larvas, minhocas, insetos e moluscos. Alguns apresentam fototoxicidade por conter moléculas fotoativas, como furanocumarinas. Certos óleos essenciais podem apresentar citotoxicidade e fototoxicidade. Muitos estudos têm demonstrado que os óleos essenciais não induzem a mutação nuclear em microorganismos, sendo, portanto, citotóxicos sem serem mutagênicos. Porém, existem óleos essenciais ou alguns de seus constituintes que são considerados carcinogênicos secundários após ativação do metabolismo. Há estudos que mostram que o metileugenol, o metilchavicol e o D-limoneno apresentaram carcinogenicidade em roedores. Alguns óleos essenciais apresentam propriedades antioxidantes, devido aos componentes terpenoídicos e fenólicos (BAKKALI *et al.*, 2008). Essa propriedade antioxidante, em particular dos constituintes fenólicos, tem feito com que os óleos essenciais sejam usados como aditivos naturais em alimentos.

Os efeitos biológicos dos óleos essenciais podem ser resultantes de um sinergismo entre todos os constituintes ou serem resultados dos principais constituintes dos mesmos. Geralmente, os constituintes majoritários são responsáveis pelas características biofísicas e biológicas, sendo que os efeitos dependem de sua concentração. No entanto, mesmo os constituintes em menores quantidades podem apresentar atividades biológicas. É provável que os vários constituintes desempenhem um papel na determinação da fragrância, da densidade, da textura, da coloração e, acima de tudo, na penetração e na distribuição celular (BAKKALI *et al.*, 2008; BURT, 2004).

1.3.1 Terpenos

Os terpenóides, também conhecidos como isoprenóides, constituem a maior classe de substâncias naturais, apresentando mais de 40.000 moléculas diferentes. Os terpenóides subdividem-se em monoterpenóides (C_{10}), sesquiterpenóides (C_{15}), diterpenóides (C_{20}), sesterterpenóides (C_{25}), triterpenóides (C_{30}) e tetraterpenóides (C_{40}) (AHARONI *et al.*, 2010). São formados (Fig. 11) a partir de combinações de unidades com cinco átomos de carbono, denominadas de pirofosfato de γ - γ -dimetilalila (PPDMA) e pirofosfato do isopentenila (PPI), conhecidas como unidades isoprênicas (BAKKALI *et al.*, 2008; DEWICK, 2009).

Os terpenóides possuem um grande potencial comercial, já que podem ser usados como flavorizantes em alimentos e como fragância em cosméticos. São importantes na qualidade dos produtos agrícolas, os quais interferem nos sabores das frutas e nos cheiros das flores. Apresentam propriedades medicinais, tais como: anti-carcinogênica, anti-ulcerogênica, antimalarial, antimicrobiana e diurética (AHARONI *et al.*, 2005). Terpenóides mostram-se, ainda, envolvidos em interações entre plantas, entre plantas e microorganismos e entre plantas e artrópodes herbívoros (AHARONI *et al.*, 2005).

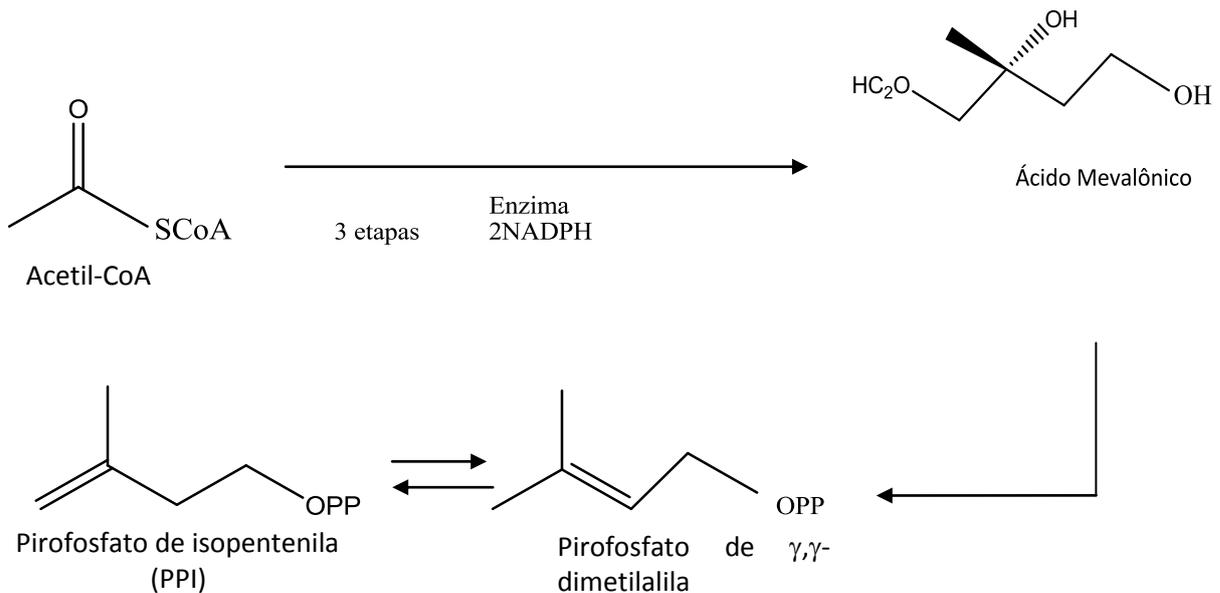


Figura 11 - Biossíntese do ácido mevalônico e dos pirofosfatos de isopentenila e γ,γ -dimetilalila

1.3.1.1 Monoterpenos

Os monoterpenos são formados pelo acoplamento de duas unidades isoprênicas, o que permite uma grande variedade estrutural, e representam 90% dos constituintes dos óleos essenciais (BAKKALI *et al.*, 2008).

A biossíntese dos monoterpenos ocorre pelo acoplamento de unidades de PPDMA e PPI, catalisada pela enzima prenil-transferase, formando a unidade básica denominada de pirofosfato de geranila (PPG) que envolve a ionização de PPDMA, com a formação de um cátion alílico e com adição à ligação dupla à molécula de PPI (Fig. 12).

Os monoterpenos são considerados a maior classe de metabólitos especiais de considerável valor econômico. Sua maior ocorrência se dá nas plantas, porém, são encontrados em alguns animais e microorganismos (EISENREICH, 1997). Os monoterpenos têm sabor e aroma agradáveis quando usados em pequenas concentrações. São extraídos de várias plantas desde os tempos antigos e, usados como aditivos para alimentos. Por exemplo, o consumo *per capita* do mentol nos alimentos nos Estados Unidos tem sido de 0,1 mg/ kg/ dia (MÜHLBAUER, 2003). Os monoterpenos são lipofílicos e, por isso, atravessam facilmente as membranas celulares, sendo facilmente absorvidos pela pele e pulmões. Têm sido usados ao

longo da história em pomadas e bálsamos medicinais, aditivos para banho e para aliviar constipações da cabeça e do peito, bem como para dores musculares (MÜHLBAUER, 2003).

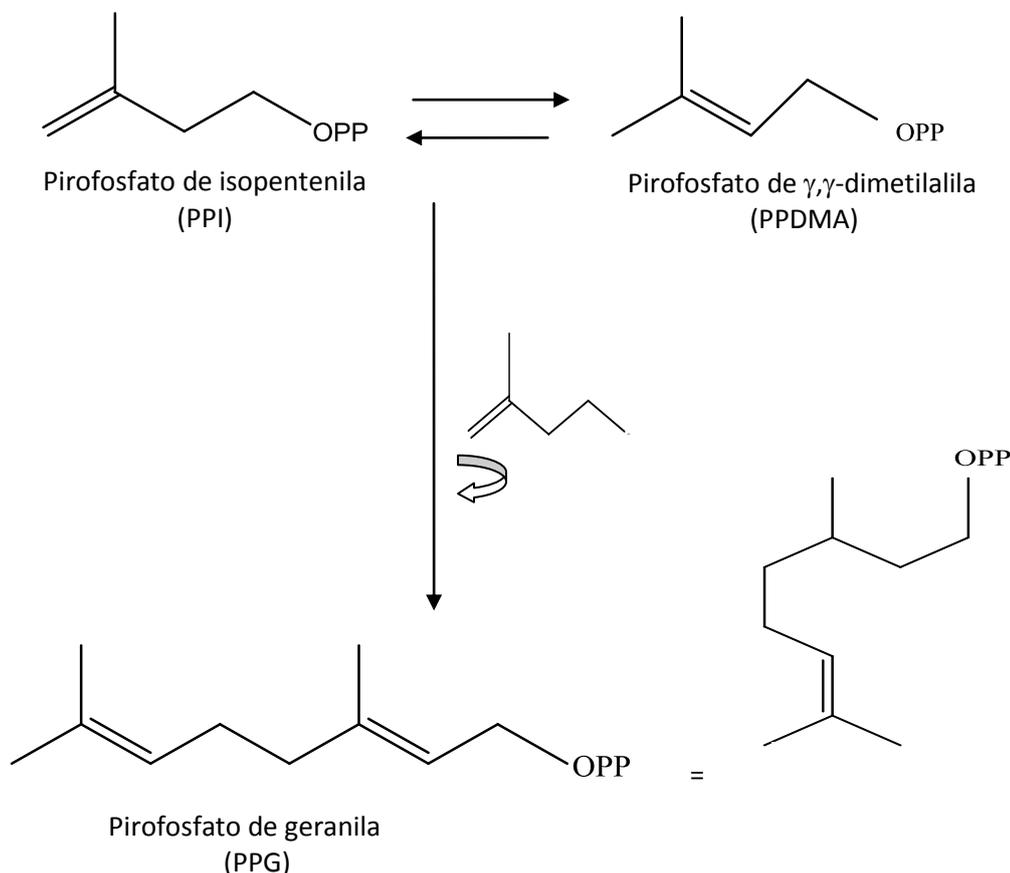


Figura 12 – Esquema biossintético de formação do precursor dos monoterpênicos (PPG)

Como exemplos de espécies ricas em monoterpênicos, citam-se *Cinnamomum camphora* (Lauraceae), rica em cânfora (27 – 45 %) e cineol (4 – 21 %); *Cymbopogon winterianus*, *C. nardus* (Graminae/Poaceae) com os constituintes (+)-citronelol (25 – 55 %) e geraniol (20 – 40 %); *Eucalyptus globulus*, *E. smithii*, *E. polybractea* (Myrtaceae) com os constituintes 1,8-cineol (eucaliptol; 70–85%) e α -pineno (14 %); *Lavandula angustifolia*, *L. officinalis* (Lamiaceae) com os constituintes acetato de linalila (25 – 45 %) e linalol (25 – 38 %); *Citrus limon* (Rutaceae) com constituintes (+)-limoneno (60 – 80 %) e β -pineno (8 – 12 %); *Citrus aurantium* ssp. *amara* (Rutaceae) com os constituintes (+)-limoneno (92 – 94 %) e mirceno (2 %); *Mentha x piperita* (Lamiaceae) com constituintes mentol (30 – 50 %) e mentona (15–

32 %); *Rosa damascena*, *R. gallica*, *R. alba*, and *R. centifolia* (Rosaceae) com os constituintes citrionelol (36 %) e geraniol (17 %); *Salvia officinalis* (Lamiaceae) rica em tujona (40 – 60 %) e cânfora (5 – 22 %) (DEWICK, 2009).

1.3.2 Sesquiterpenóides

Os sesquiterpenóides formam a maior classe de terpenóides encontrados em plantas, musgos, fungos e algas. São originados de três unidades de isoprenos (C₁₅), sendo formados pela condensação do PPI com PPG para produzir o pirofostato de farnesila (PPF) (Fig. 17). Possuem propriedades biológicas de repelência a insetos, polinização e regulação do crescimento em plantas (BRAMLEY, 1997; DEWICK, 2009).

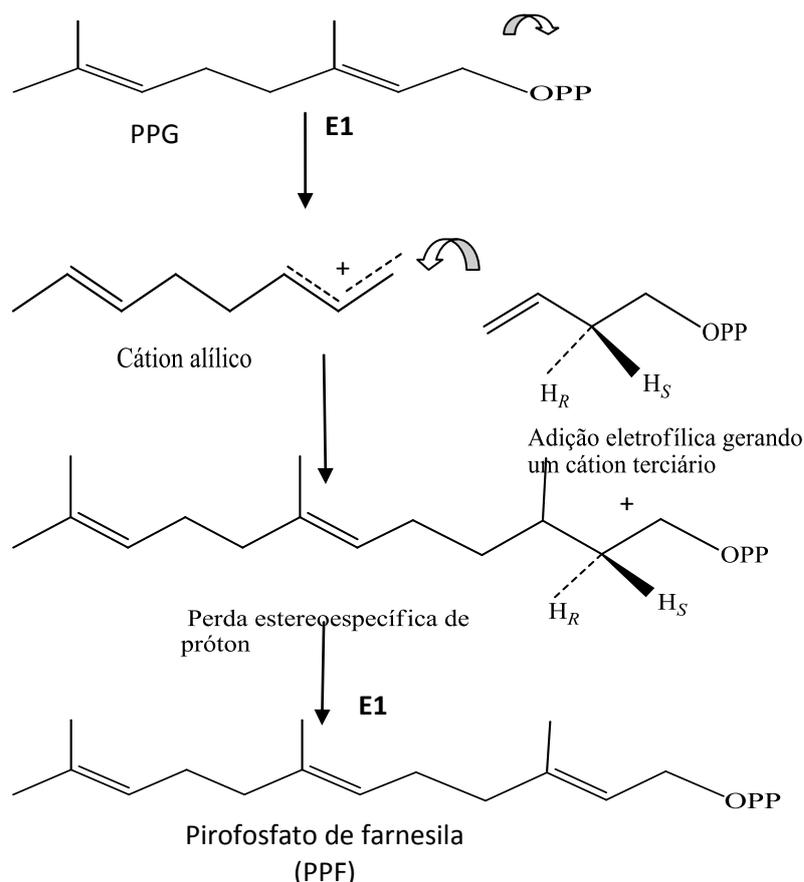


Figura 13- Esquema biossintético de formação do precursor dos sesquiterpenos (PPF)

Como exemplos de espécies ricas em sesquiterpenos, citam-se *Tanacetum parthenium* (Compositae/Asteraceae) com o constituinte partenolido; *A. cinia*; (Compositae/Asteraceae) com o constituinte α -santonina; *Matricaria chamomilla* (*Chamomilla recutita*) (Compositae/Asteraceae) com os constituintes α -bisabolol, óxidos de bisabolol A e B e camazuleno; *Humulus lupulus* (Cannabaceae) com o constituinte humuleno; *Syzygium aromaticum* (Myrtaceae) e *Cinnamomum zeylanicum* (Lauraceae) ricas em β -cariofileno (DEWICK, 2009).

1.3.3 Arilpropanóides

Os ácidos cinâmicos são precursores (Fig. 14) da maioria dos arilpropanóides, que são substâncias aromáticas com uma cadeia lateral formada por três átomos de carbono ligada ao anel aromático. A fenilalanina é precursora do ácido cinâmico que, pela ação da enzima fenilalanina amonialiase, perde uma molécula de amônia, originando o ácido cinâmico (SIMÕES, 2000; DEWICK, 2009).

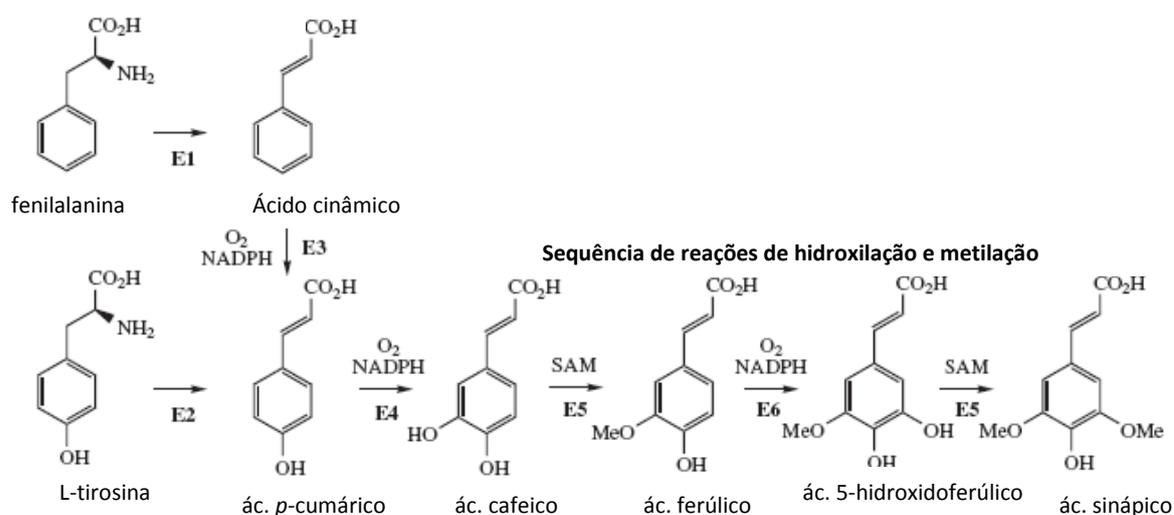


Figura 14 - Esquema biossintético de formação de ácidos cinâmicos

Fonte: Adaptado de Dewick, 2009.

Os arilpropanóides ocorrem em várias espécies vegetais. Como exemplos têm-se *Pimpinella anisum* (Apiaceae), conhecida como “anis”, e *Illicium verum* (Illiciaceae) ricas em anetol (80 – 90 %) e metilchavicol (1 – 6 %); *Cinnamomum cassia* (Lauraceae) com os constituintes cinamaldeído (70 – 90 %) e 2-

metoxicinamaldeído (12 %); *Cinnamomum zeylanicum* (Lauraceae), cujas cascas são ricas em cinamaldeído (70 – 80 %), eugenol (1 – 13 %) e acetato de cinamila (3 - 4 %); *Cinnamomum zeylanicum* (Lauraceae), cujas folhas possuem como constituinte majoritário o eugenol (70 – 95 %); *Syzygium aromaticum* (sin. *Eugenia caryophyllus*, Myrtaceae) com os constituintes eugenol (75 – 90 %), acetato de eugenila (10 – 15 %) e *E-β*-cariofileno (3 %); *Foeniculum vulgare* (Apiaceae), espécie rica em anetol (50 – 70 %), fenchona (10 – 20 %) e metilchavicol (3 – 20 %) (DEWICK, 2009).

1.4 Candidíase e atividade antimicrobiana de óleos voláteis

1.4.1 *Candida*

O gênero *Candida* conta com 163 espécies e, aproximadamente, 10 são responsáveis pelas infecções humanas, causando micoses superficiais ou invasivas. A espécie mais importante é *Candida albicans* que é um patógeno oportunista e que pode causar infecções sistêmicas ou locais em indivíduos predispostos que, normalmente, estão imunodeprimidos e aqueles que estão em tratamento prolongado por uso de antibióticos (CASTRO *et al.*, 2006; DUARTE *et al.*, 2005).

A *Candida* é uma levedura que possui a forma de micélio e hifa, mantendo-se na maioria das vezes na morfologia de hifas, exibindo a característica de um pseudomicélio, quando está em certos ambientes nutricionais (Fig. 15) (CASTRO *et al.*, 2006).



Figura 15 - Microscopia eletrônica mostrando uma colônia de *C. albicans*.
fonte: <http://www.sciencephoto.com>

Espécies do gênero *Candida* são cosmopolitas e, algumas, fazem parte da microbiota do homem e animais, colonizando as mucosas do trato gastrointestinal

(50 -70 %), da boca (30 – 50 %), da vagina (5 – 30 %) e da pele (4 -7 %) (CASTRO *et al.*, 2006).

Infecções por fungos vêm aumentando ao longo dessas duas décadas devido ao aumento da incidência de pacientes imunodeprimidos que recebem hiperalimentação parenteral, aos que fazem uso de antibióticos de amplo espectro, e aos que fazem uso de cateter intravascular (POZZATTI *et al.*, 2010; KANAFANI, *et al.*, 2008; NIIMI, *et al.*, 2010; WARNKER, *et al.*, 2009). Embora a *C. albicans* seja responsável pela maioria das infecções humanas por leveduras, várias outras espécies desse gênero podem ser associadas às infecções, tais como *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lypolytica*, *C. norvegensis*, *C. inconspícua*, entre outras (CASTRO *et al.*, 2006; POZZATTI *et al.*, 2010).

O tratamento utilizado para candidíase é focado em derivados azólicos. Com o tempo houve aumento da resistência dos fungos ao tratamento com estas drogas (CASTRO *et al.*, 2006). Plantas são tradicionalmente usadas para o tratamento de diferentes infecções, inclusive infecções por fungos. Os óleos essenciais são um dos mais promissores grupos de substâncias naturais para serem utilizados como agentes antimicrobianos e antifúngicos (SAAD, *et al.*, 2010).

1.4.2 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

Os óleos essenciais têm sido usados amplamente como antimicrobianos, devido à sua atividade antibacteriana e antifúngica (BAKKALI *et al.*, 2008). Substâncias fenólicas são responsáveis pela atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. O mecanismo pelos quais os óleos essenciais podem inibir os microorganismos envolve diferentes modos de ação e, em parte, pela sua hidrofobicidade. Assim, os componentes dos óleos essenciais ficam divididos na bicamada lipídica da membrana celular, afetando a cadeia respiratória e a produção de energia. Isso faz com que os componentes dos óleos essenciais sejam mais permeáveis, inclusive, que os antibióticos (SAAD *et al.*, 2010).

Existem diversos trabalhos científicos que apresentam produtos naturais ativos contra espécies de *Candida*. Nos últimos dez anos houve um crescimento no número de trabalhos, sendo que, atualmente, tem-se o registro de 285 espécies de 94 famílias que possuem alguma atividade contra *Candida* (DUARTE *et al.*, 2005). Óleos essenciais de *Majorana syriaca*, *Satureja thymbra*, *Micromeria fruticosa* e *Salvia triloba* apresentaram atividade antifúngica *in vitro*. Os óleos de *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum*, *O. gratissimum* também apresentaram forte atividade antifúngica (OXENHAM *et al.*, 2005; FARIA *et al.*, 2006). Ainda, citam-se como exemplos, os óleos essenciais de *Achillea millefolium*, *Mikania aglomerata* e *Stachys byzantina* com forte atividade contra *C. albicans* (DUARTE *et al.*, 2005). Estudo realizado pela Universidade Agrícola da Escócia com dois quimiotipos do óleo essencial do *O. basilicum* mostrou efeitos fungicidas e fungistáticos desses óleos frente às cepas de *Botrytis fabae*. Os dois quimiotipos de *O. basilicum* produzem óleos ricos em metilchavicol e linalol que apresentaram atividade antimicrobiana. Os estudos mostraram que os óleos essenciais reduziram, *in vivo*, o crescimento micelar do fungo *B. fabae* e a infecção das folhas de feijão causado pelo fungo *Uromyces fabae* (OXENHAM *et al.*, 2005).

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Analisar os constituintes voláteis de diferentes indivíduos de *Ocimum selloi*, *Hesperozygis myrtoides* e *Mentha pulegium* (Lamiaceae) e correlacionar a composição volátil com possíveis quimiotipos, além de avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e realizar estudo de estabilidade acelerado.

2.2 Objetivos específicos

- I- coletar e identificar as espécies selecionadas para estudo;
- II- extrair o óleo essencial dos diferentes indivíduos por hidrodestilação usando aparelho de Clevenger modificado, segundo protocolos adotados pelo laboratório de Fitoquímica e Farmacognosia do DPNA-FF-UFRJ;
- III- elucidar as estruturas dos constituintes químicos majoritários do óleo essencial dos diferentes indivíduos de *Ocimum selloi*, *Hesperozygis myrtoides* e *Mentha pulegium*;
- IV- determinar o quimiotipo de exemplares da espécie *O. selloi* comercializada em feiras-livres em Petrópolis, Itaguaí e Madureira;
- V- determinar os CIM dos óleos essenciais das espécies em estudo;
- VI- testar o efeito de sinergismo entre os óleos essenciais;
- VII- realizar ensaios de estabilidade acelerado dos óleos essenciais, segundo metodologia ANVISA.

3 Metodologia

3.1 Material vegetal

3.1.1 Folhas frescas de *Ocimum selloi* Benth para extração do óleo essencial foram adquiridas em feiras-livres, em 2009 e 2010, na região Serrana (Petrópolis), na cidade do Rio de Janeiro (região Oeste, Madureira) e na cidade de Itaguaí. As plantas foram identificadas pelo Dr. R. M. Harley e estão depositadas no RFA - Herbário da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/ RJ, sob os números RFA36976, RFA36977 e RFA36978. Pesquisa etnobotânica prévia realizada por Leitão (2009) mostrou que as amostras de *O. selloi* comercializadas em feiras-livres na Região Serrana provém de um mesmo cultivar (LEITÃO, 2009).

3.1.2 Folhas frescas de *Hesperozygis myrtoides* Epling foram coletadas em abril de 2010 para a extração de óleo essencial na Serra do Papagaio, em local conhecido como Vale dos Poejos, em Aiuruoca/ MG, localizado na Serra da Mantiqueira, Lat/Lon: 22° 2 31.83 s / 44°38 30.20 W (Pico do Papagaio). As plantas foram identificadas pelo Dr. R. M. Harley e depositados no HUEFS - Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (Feira de Santana, Bahia) sob o número de 1333584.

3.1.3 Folhas frescas de *Mentha pulegium* L. foram adquiridas da empresa Bioervas em outubro de 2010. Essa espécie foi cultivada a partir de plantas certificadas pela própria empresa, para a extração do óleo essencial na cidade de Tombos/ MG.

3. 2 Extração e análises do óleo essencial

3.2.1 Folhas frescas das três plantas (cerca de 150g por extração) foram submetidas à hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado (Fig. 16) para obtenção dos componentes voláteis. As extrações foram feitas no laboratório de Fitoquímica e Farmacognosia do DPNA-FF-UFRJ, no laboratório PN4 do Departamento de Produtos Naturais de Farmanguinhos, Fiocruz e no laboratório da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro. Os óleos essenciais obtidos

foram quantificados e reunidos para se proceder com os testes de atividade antimicrobiana (Tabela 4).

Tabela 4 – Aquisição das plantas para obtenção do óleo essencial

Plantas	Local de Aquisição	Mês de Coleta	Material (g)
<i>O. selloi</i>	Itaguaí	Setembro/ 2009	60,0
<i>O. selloi</i>	Petrópolis	Novembro/ 2009	800,0
<i>O. selloi</i>	Petrópolis	Janeiro/ 2010	250,0
<i>O. selloi</i>	Itaguaí	Fevereiro/ 2010	240,0
<i>O. selloi</i>	Madureira	Março e Abril/ 2010	254,0
<i>H. myrtooides</i> *	Aiuruoca	Abril/ 2010	3.802,0
<i>M. pulegium</i>	Tombos	Outubro/ 2010	5000,0

* Planta coletada em Aiuruoca/ MG, Serra do Papagaio no Vale do Poejo.



Figura 16 - Aparelho de Clevenger Modificado
Fonte: Coleção particular do Autor

3.2.2 Os óleos essenciais foram analisados na Embrapa Agroindústria de Alimentos, Guaratiba, Rio de Janeiro/ RJ, em colaboração com o Dr. Humberto Bizzo, por cromatografia com fase gasosa em equipamento Agilent 7890, equipado com detector por ionização em chama (DIC), coluna HP-5 (30 m x 0,32 mm X 0,25 µm), usando H₂ (1,5 ml/ min) como gás de arraste. A temperatura do injetor foi mantida em 250° C e a programação de temperatura do forno variou de 60° a 240° C em 3° C min.⁻¹. A temperatura do detector foi mantida em 280° C. O volume de injeção para todas as análises foi de 1µl do óleo essencial em solução de diclorometano (1000 ppm), em modo sem divisão de fluxo.

As análises por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foram realizadas em equipamento da marca Agilent 6890

(cromatógrafo) e 5973N (detector de massas), operando em modo de impacto de elétrons (70 eV), equipado com coluna HP-5 (30 m x 0,32 mm X 0,25 µm), usando hélio (1,5 ml/ min) como gás de arraste. A temperatura do injetor foi mantida em 260° C e a programação de temperatura do forno variou de 60° a 240° C em 3° C min.⁻¹. O volume de injeção para todas as análises foi de 1 µl do óleo essencial em solução de diclorometano (1000 pm) em modo sem divisão de fluxo.

Para obtenção dos Índices de Retenção de Kovats (IRK) utilizou-se uma solução composta por n-alcanos (C₇ – C₂₆) que foi analisada por CG-DIC, nos mesmos parâmetros descritos anteriormente (VAN *et al.*, 1963).

As substâncias foram identificadas por comparação de seus espectros de massas com registros de bancos de dados (WHILEY7N e NIST 107.LIB) e por comparação do IRK calculados com aqueles da literatura (ADAMS, 1995).

3. 3 Testes da atividade antimicrobiana

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados nos laboratórios dos professores Celuta S. Alviano (Departamento de Microbiologia da UFRJ) e Paulo Murillo Neufeld (Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFRJ).

3.3.1 Teste de difusão em Agar (*Drop Test*)

Os óleos essenciais puros ou em mistura foram submetidos a testes para detecção da atividade antimicrobiana contra cepas de *Candida albicans* tipo B ATCC 36802, *Staphylococcus aureus* MRSA (BMB9393), *Escherichia coli*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus Níger* e *Trychophyton rubrum*. Soluções contendo os microorganismos (2×10^5 de células) foram inoculadas em placas de Petri, previamente preparadas em meio sólido. Após 10 minutos da inoculação foi adicionado 1 µl do óleo essencial no centro de cada placa. Todas as placas foram incubadas a 37 °C em tempo variável de 24 h a 7 dias, dependendo do microorganismo testado. Após o tempo de incubação, a zona de inibição foi medida em centímetros (HILL *et al.*, 1997).

Os óleos essenciais de *O. selloi* e *H. myrtooides* foram misturados na proporção de 4:1, 3:1, 2:1 e 1:1 e submetidos ao mesmo teste.

3.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os óleos essenciais puros de *O. selloi*, *H. myrtooides* e *M. pulegium* foram testados em cepas clínicas de espécies de *Cândida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*). Não foram feitas associações entre os diferentes óleos. A concentração inibitória mínima (MIC) foi determinada pelo método de diluição em caldo de acordo com o documento M27- A3 (*C. albicans*) da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), usando resazurina como indicadora para viabilidade celular (SARKERS *et al.*, 2007). Todas as determinações foram feitas em triplicatas e em duas experiências, independentes de levar a resultados concordantes. Fluconazol foi usado como controle positivo.

3. 4 Teste de estabilidade acelerado

O teste de estabilidade acelerado foi realizado no Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFRJ, de responsabilidade do Prof. Lúcio Mendes Cabral. Os óleos essenciais foram mantidos em uma câmara climatizada (Nova Ética) (Fig. 17), sendo submetidos a uma temperatura controlada de 40°C e umidade de 75%. O teste de estabilidade acelerado foi realizado segundo metodologia ANVISA (40 °C ± 2 °C / 75 % ± 5 % U.R. / 0, 3 e 6 meses) (ANVISA, 2005).

O volume dos óleos essenciais separados para o teste de estabilidade foi de 1 ml. Uma alíquota (0,1 ml) de óleo foi retirada a cada mês para se proceder com as análises por CG-EM e, também, para verificação das características organolépticas dos mesmos (aroma e cor). A primeira análise dos óleos foi feita no primeiro dia em que os óleos foram transferidos para a câmara de estabilidade.



Figura 17- Câmara de Estabilidade
Fonte: Coleção particular do Autor

4 Resultados e Discussão

4.1 Teor e análise dos óleos essenciais de *O. selloi*, *H. myrtooides* e *M. pulegium*

4.1.1 *O. selloi* - O óleo essencial de *O. selloi* apresentou-se incolor e bastante aromático, com odor característico de “anis”. As extrações mostraram que o teor de óleo essencial variou de 0,35 % a 0,56 % (Tabela 5). Assim, considerando-se 100g do material vegetal fresco pode-se obter até 0,5 ml de óleo puro, já que o mesmo separa-se com muita facilidade da fase aquosa. Este rendimento é bastante satisfatório em se tratando de óleos essenciais, uma vez que o teor médio obtido de plantas produtoras de voláteis fica em torno de 0,1 %. A seguir são apresentados os teores e a composição dos óleos analisados:

1ª Aquisição (Setembro, amostra adquirida na cidade do Rio de Janeiro, porém, de cultivo em Itaguaí/ RJ) - O teor de óleo essencial (apenas uma extração) das folhas de *O. selloi* foi estimado em 0,5 % (Tabela 5). Análise por CG-EM mostrou a presença de metilchavicol com alto teor na mistura (95,9 %);

2ª Aquisição (Novembro, Região Serrana, Petrópolis/ RJ) – O teor médio de óleo essencial foi de 0,35 % \pm 0,18 (Tabela 5). Este teor é consideravelmente menor do que o teor de óleo da amostra da planta coletada na cidade de Itaguaí (0,5 %). Novamente, foi detectado no óleo de *O. selloi* a substância metilchavicol em alto teor na mistura (92,7 %);

3ª Aquisição (Janeiro, Região Serrana, Petrópolis/ RJ) – O teor médio de óleo essencial foi estimado em 0,48 % \pm 0,05 (Tabela 5), portanto, maior do que o teor obtido com a coleta no mês de novembro nesta mesma região. A substância principal foi novamente identificada como metilchavicol, com alto teor na mistura (93,6 %).

4ª Aquisição (Fevereiro, amostra adquirida na cidade do Rio de Janeiro, porém, de cultivo em Itaguaí/ RJ) - O teor médio de óleo essencial das folhas de *O. selloi* foi de 0,55 % ± 0,07 (Tabela 5). A substância principal foi novamente identificada como metilchavicol, com alto teor na mistura (94,9 %)

5ª Aquisição (Março, amostra adquirida em Madureira, na cidade do Rio de Janeiro, RJ) – O teor médio de óleo essencial das folhas de *O. selloi* foi de 0,45 % ± 0,09 (Tabela 5). A substância principal identificada foi o metilchavicol (94,7 %).

6ª Aquisição (Abril, amostra adquirida em Madureira, na cidade do Rio de Janeiro, RJ) – O teor do óleo analisado das folhas de *O. selloi* foi de 0,56 % (Tabela 5). A substância principal identificada também foi o metilchavicol com um alto teor na mistura (97,6 %).

Tabela 5 – Teor percentual dos óleos essenciais extraídos das folhas do *O. selloi*

	Mês e Ano de coleta/ Local					
	Set/2009 Itaguaí	Nov/2009 Petrópolis	Jan/2010 Petrópolis	Fev/2010 Itaguaí	Mar/2010 Madureira	Abril/2010 Madureira
Teor %	0,50	0,35 ± 0,18	0,48 ± 0,05	0,55 ± 0,07	0,45 ± 0,09	0,56

Análises por CG-EM dos óleos obtidos mostraram a presença do metilchavicol (Figs. 6a, pág. 5 e 18) em alta concentração em todas as amostras (Tabela 6). Esse resultado é muito importante, pois evidencia uma substância praticamente pura no óleo essencial de *O. selloi*. Uma vez que o metilchavicol foi identificado em todos os óleos essenciais, tanto nas plantas coletadas na cidade do Rio de Janeiro, como nas plantas obtidas da região Serrana, pode-se afirmar que as amostras de *O. selloi* tratam-se do mesmo quimiotipo.

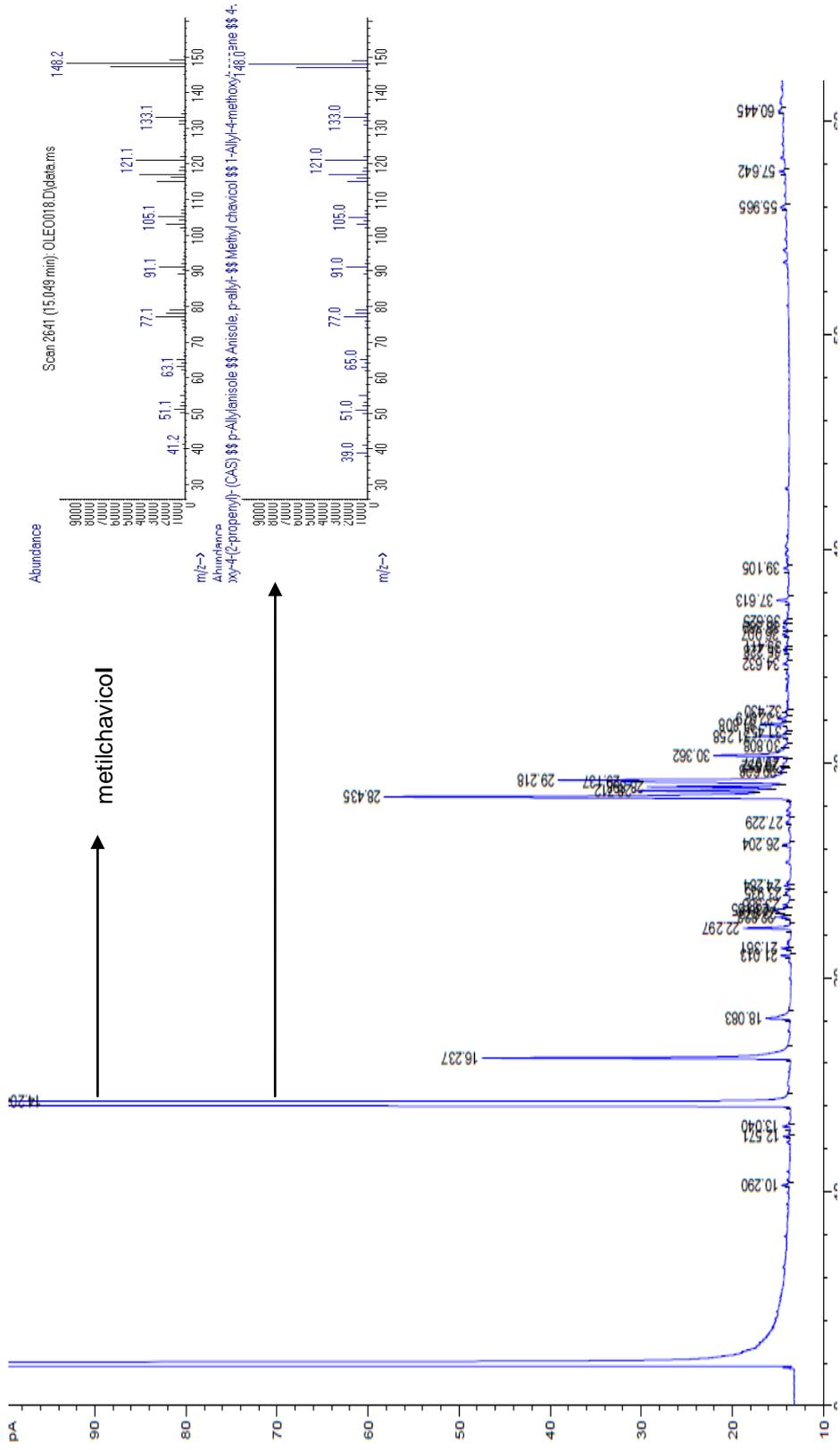


Figura 18 - Cromatograma do óleo essencial do *O. selloi*. (amostra de Madureira – Março 2010)

O metilchavicol, também denominado estragol, é um arilpropanóide que confere aroma de “anis” a algumas espécies vegetais. Esta substância é responsável por várias atividades biológicas, incluindo, nematicida e inseticida (DAVID *et al.*, 2006). É bastante usado na indústria de perfumes e é o componente principal dos óleos essenciais de plantas medicinais pertencentes a diversas famílias vegetais, tais como, Apiaceae (*Pimpinella anisum* L., “anis”; *Foeniculum vulgare* Mill., “funcho”), Magnoliaceae (*Illicium verum* Hook f., “anis estrelado”) e Asteraceae (*Artemisia dracunculoides* L., “estragão”) (PAULA *et al.*, 2007)

Considerando-se as demais substâncias identificadas nos óleos analisados, o sesquiterpeno biciclogermacreno foi detectado em todas as amostras e com teor que variou de 0,4% a 1,7%, além do β -cariofileno que foi identificado com teor que variou de 0,6 a 1,0%. As substâncias α -copaeno, metileugenol, 3-octen-1-ol e α -bisaboleno também foram identificados em todas as amostras, porém, em quantidade percentual muito reduzida (Tabela 6).

Estudos realizados com a espécie *O. selloi* Benth evidenciaram também a presença majoritária do metilchavicol. Martins e colaboradores (1997) estudaram dois acessos de *O. selloi* que foram coletados na cidade de Viçosa/ MG. Um total de 100 g de folhas foram submetidos à hidrodestilação, com rendimento de 0,31 % do acesso A e 0,47 % do acesso B. O metilchavicol foi a substância identificada como majoritária encontrada no acesso A, com teor de 80,7 %. Já a planta do acesso B mostrou uma composição volátil distinta, pois apresentou o metileugenol como majoritário e com teor percentual de 63,1 %. O sesquiterpeno germacreno B foi detectado nos dois acessos e com teor de 4,6 % no acesso A e 11,9 % no acesso B. As substâncias bergamoteno, *trans*-cariofileno e β -bisaboleno foram identificadas nos dois acessos, porém, em menores quantidades.

Outro estudo realizado com amostras de dois acessos de *O. selloi* (A e B), também em Viçosa/ MG (MAIA *et al.*, 2007), mostrou teores de óleo essencial de 0,31 % para o acesso A e de 0,21 % para o acesso B. A substância majoritária identificada no óleo essencial das plantas do acesso A foi o metilchavicol, com alto percentual relativo (94,9 %). No entanto, as plantas do acesso B mostraram um óleo essencial com alto teor de metileugenol (63,1 %). Esses resultados são consistentes com aqueles publicados por Martins e colaboradores (1997).

Costa e colaboradores (2007) avaliaram a composição química volátil das folhas de *O. selloi* coletadas na cidade de Lavras/ MG. Cerca de 40 g de folhas foram

submetidas à hidrodestilação, produzindo um rendimento de 0,13 % de óleo essencial. Novamente, a substância metilchavicol foi identificada como a majoritária (93,9 %). As substâncias metileugenol, β -bisaboleno, espatulenol e óxido de cariofileno foram identificadas em menores quantidades.

Moraes e colaboradores (2002) pesquisaram os constituintes voláteis das folhas dessa espécie que foram coletadas na cidade de Botucatu/ SP. Cerca de 100 g de folhas foram coletadas em dois meses diferentes (Junho de 2000 e em Janeiro de 2001), e submetidas à hidrodestilação, produzindo um rendimento de 0,25 % e 0,20%, respectivamente. A substância *trans*-anetol foi identificada como a majoritária dos óleos obtidos a partir das duas coletas, com teor de 45,4 % (Junho de 2000) e de 58,6 % (Janeiro de 2001). A substância metilchavicol também foi identificada, com teor de 24,1 % no mês de Junho de 2000 e 29,9 % no mês de Janeiro de 2001. As substâncias *cis*-anetol, metileugenol, *trans*-cariofileno, germacreno D e β -selineno foram identificadas nos óleos das duas amostras de *O. selloi*, porém, em menores percentuais.

Um estudo realizado com indivíduos de *O. selloi* coletados em Ponta Grossa/ PR (PAULA *et al.*,2007) mostrou novamente que o metilchavicol é o constituinte majoritário do óleo essencial (55,3 %). A substância *trans*-anetol também foi identificada em alto teor percentual (34,2 %).

As tabelas 6 e 7 resumem a composição química dos óleos essenciais de *O. selloi* estudados e aqueles publicados na literatura. Estes estudos mostram que podem existir três diferentes quimiotipos para *O. selloi*, sendo um rico em **metilchavicol**, outro com alto teor de **metileugenol** e um terceiro rico em **metilchavicol e trans-anetol**.

Todas as amostras de *O. selloi* estudadas que foram coletadas tanto ao nível do mar (Rio de Janeiro) como na Região Serrana (Petrópolis), mostraram-se com alto teor de metilchavicol. Uma vez que essas amostras foram adquiridas de feiras-livres e de comerciantes que as obtiveram de cultivo próprio, pode-se supor que os cultivares provém do mesmo acesso. Estudos genéticos são necessários para confirmar esta hipótese.

Tabela 6 – Substâncias identificadas nos óleos essenciais de folhas de *O. selloi*

Substância Identificada	IR _{calc.}	IR _{lit.}	Teor %/ Local/ Mês e Ano de Coleta/Teor 2%						
			A 09/ 2009	B 11/ 2009	B 11/ 2009	B 01/ 2010	A 02/ 2010	C 03/ 2010	C 04/ 2010
3-octen-1-ol	980	978	0,2	0,5	0,4	0,6	0,4	0,2	0,1
limoneno	1031	1031	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
metilchavicol	1204	1195	95,9	92,7	93,6	94,6	94,9	94,7	97,6
<i>cis</i> -anetol	1253	1251	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
δ -elemeno	1435	1433	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>trans</i> -anetol	1286	1283	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
α -copaeno	1377	1376	0,1	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1
β -bourboneno	1384	1384	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0
β -elemeno	1407	1391	0,1	0,2	0,2	0,0	0,2	0,2	0,1
metileugenol	1406	1401	0,1	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1
β -cariofileno	1420	1418	0,6	1,0	1,0	0,0	0,9	0,9	0,6
α - <i>t</i> -bergamoteno	1437	1436	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
α -bergamoteno	1417	1415	0,0	0,3	0,3	0,2	0,0	0,0	0,0
α -humuleno	1453	1454	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>allo</i> -aromadendreno	1460	1461	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
γ -muuruleno	1478	1477	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
germacreno D	1481	1480	0,0	1,4	1,3	1,0	0,0	0,0	0,0
biciclogermacreno	1497	1494	0,8	1,7	1,7	1,3	0,7	0,8	0,4
β -bisaboleno	1510	1509	0,1	0,4	0,5	0,5	0,1	0,2	0,1
δ -cadieno	1523	1524	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

A = Itaguaí; B = Petrópolis; C = Madureira.

Tabela 7 – Comparação da composição química dos óleos essenciais em estudo com aqueles da literatura (Viçosa, Lavras, Botucatu, Ponta Grossa)

Substância	Rio de Janeiro Itaguaí		Rio de Janeiro Região Serrana			Rio de Janeiro Madureira		Minas Gerais Viçosa ^{1,2}		Minas Gerais Lavras ³	São Paulo Botucatu ⁴		Paraná Ponta Grossa ⁵ 2005
	Set. 2009	Fev. 2010	Nov. 2009	Nov. 2009	Jan. 2010	Mar. 2010	Abril 2010	A 1995	B 1995		Jun. 2000	Jan. 2001	
metilchavicol	95,9	94,9	92,7	93,6	94,6	94,7	97,6	80,7	—	93,9	24,1	29,9	55,3
biciclo-germ.*	0,8	0,7	1,7	1,7	1,3	0,8	0,4	—	—	—	—	—	—
β-cariofileno	0,6	0,9	1,0	1,0	0,9	0,9	0,6	—	—	—	—	—	—
α-copaeno	0,1	0,1	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1	—	—	—	—	—	—
metileugenol	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,1	—	63,1	0,3	0,1	0,1	—
3-octen-1-ol	0,2	0,4	0,5	0,4	0,6	0,2	0,1	—	—	—	—	—	—
β-bisaboleno	0,1	0,1	0,4	0,5	0,5	0,1	0,1	1,1	2,7	0,1	—	—	—
germacreno B	—	—	—	—	—	—	—	4,6	11,9	—	—	—	—
bicilosquisif**	—	—	—	—	—	—	—	4,6	7,8	—	—	—	—
α-bergamoteno	—	—	0,3	0,3	0,2	—	—	0,8	0,9	—	—	—	—
<i>trans</i> -cariofileno	—	—	—	—	—	—	—	4,3	6,8	—	0,8	1,8	—
espatulenol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,9	—	—	—
óxido de cariofileno	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,9	—	—	—
<i>trans</i>-anetol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	45,4	58,6	34,2
<i>cis</i> -anetol	0,1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,9	3,0	3,9
germacreno D	—	—	1,4	1,3	1,0	—	—	—	—	—	4,2	0,9	—
β-selineno	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4,1	0,9	—
β-cariofileno	0,6	0,9	1,0	1,0	0,0	0,9	0,6	—	—	—	—	—	2,1

A = plantas do acesso A; B = plantas do acesso B; bicilogerm. = bicilogermacreno; bicilosquisif = bicilosquisifelandreno. ¹MARTINS *et al.*, 1997; ²MAIA *et al.*, 2007; ³COSTA *et al.*, 2007; ⁴MORAES *et al.*, 2002; ⁵PAULA *et al.*, 2007.

4.1.2 *H. myrtooides* - O óleo essencial dessa planta mostrou-se incolor e bastante aromático, com odor característico de “menta”. As extrações (n=9) mostraram que o teor de óleo essencial variou de 1,01 a 1,72 % (Tabela 8). Assim, considerando-se 100 g do material vegetal fresco pode-se obter até 1,7 ml de óleo puro, já que o mesmo separa-se com muita facilidade da fase aquosa. Este rendimento pode ser considerado satisfatório (Tabela 8).

Tabela 8 – Teor percentual dos óleos essências extraídos das folhas do *H. myrtooides*

Mês/Ano	Abril/ 2010			Maio/ 2010					
	27	28	29	03	07	10	14	17	18
Data									
Teor %	1,72	1,61	1,47	1,01	1,55	1,69	1,03	1,24	1,38
Teor % Médio	1,6 ± 0,12			1,32 ± 0,27					

Análise por CG-EM do óleo essencial obtido de *H. myrtooides* mostrou a presença de pulegona (44,4%) e de isomentona (32,7%) como constituintes majoritários (Fig. 10) (Tabela 9). Considerando-se as demais substâncias identificadas no óleo essencial analisado, destacam-se, também, os monoterpenos acetato de isomentila (7,0 %) e limoneno (3,5 %)(Fig.19)

A pulegona e a isomentona são monoterpenos que são responsáveis pelo odor agradável de “menta” do óleo essencial do *H. myrtooides* (Martins *et al.*, 1998). A pulegona apresenta atividade biológica como repelente de insetos, além de ser usada como abortiva e como emenagoga (TELICI *et al.*, 2010). Essa substância é metabolizada pelo sistema microsomal hepático e origina uma série de hepatotoxinas causadoras de tumores hepáticos e que estão envolvidas em muitos casos de intoxicações em humanos e animais (MUCCIARELLI *et al.* , 2000). Esta hepatotoxicidade é devida ao seu principal metabólito, denominado mentofurano. A Comissão Européia (2002) permite níveis máximos de pulegona, a saber: gêneros alimentícios (25 mg/ kg), bebidas (100 mg/ kg) e bebidas flavorizadas com hortelã-pimenta (250 mg/ kg). A recomendação da pulegona em cosméticos é de ≤ 1% (PETRAKIS *et al.*, 2009)

Tabela 9 - Substâncias identificadas na análise do óleo de *H. myrtooides*

Substâncias	IR_{cal.}	IR_{lit.}	Teor %
α -pinemo	937	939	0,2
sabinemo	976	976	0,2
β -pinemo	979	980	0,3
mirceno	992	991	0,4
limonemo	1031	1031	3,5
cis- β -ocinemo	1040	1040	0,2
acetato de heptanol	1113	1113	0,2
mentona	1156	1154	0,3
isomentona	1167	1164	32,7
α -terpineol	1189	1189	0,1
pulegona	1242	1242	44,4
acetato de isomentila	1307	1306	7,0
acetato de isopulegol	1312	1308	0,7
α -acetato de terpinila	1350	1350	0,4
n.i.*			1,1
valenceno	1493	1491	0,2
Total			91,9

* Não identificada

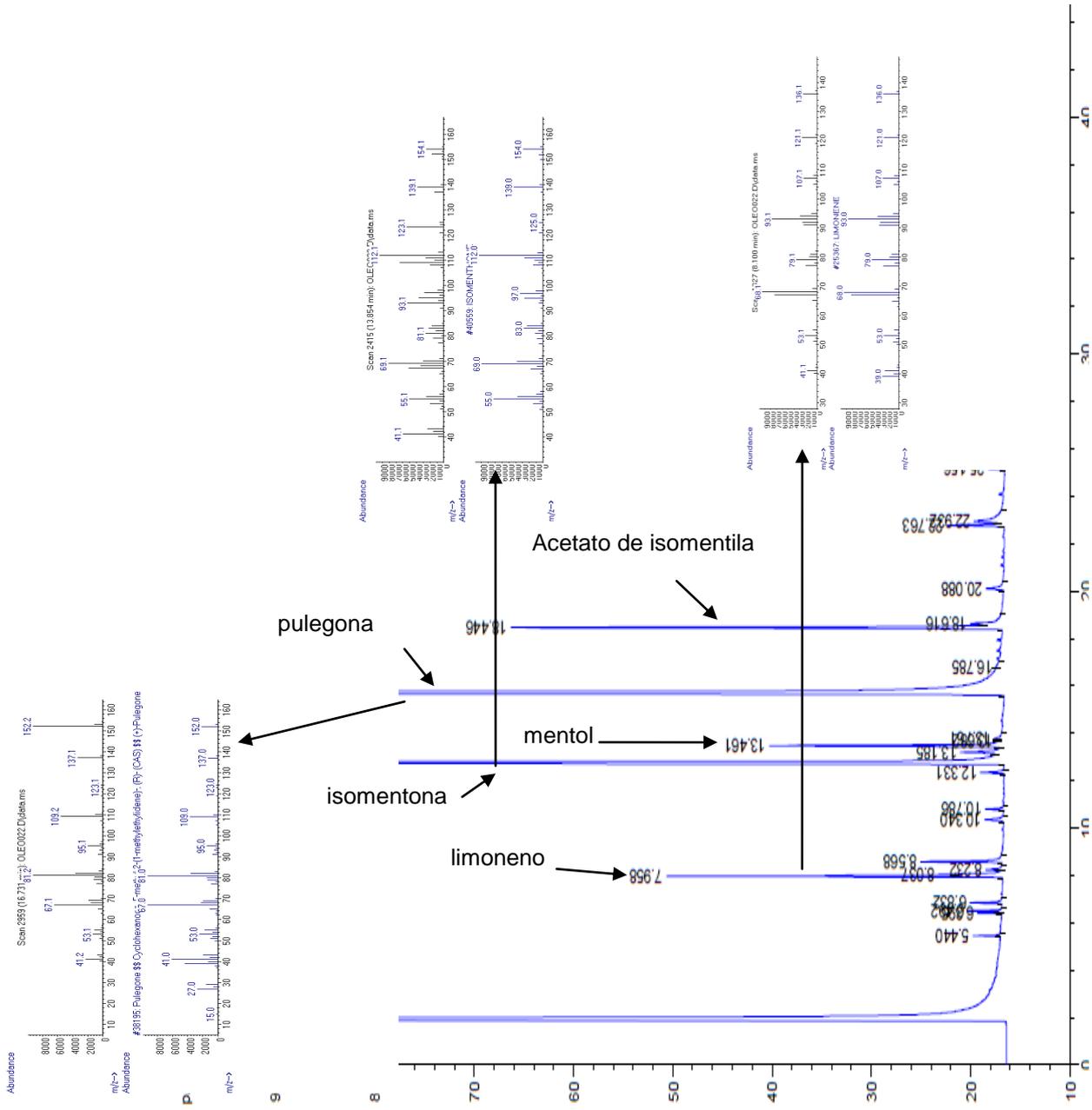


Figura19 – Cromatograma do óleo essencial de *H. myrtiloides* - amostra de Abril 2010.

4.1.3 *M. pulegium* - O óleo essencial de *M. pulegium* apresenta-se límpido e bastante aromático, com odor característico de “menta”. Duas extrações do óleo essencial foram realizadas e produziram um teor de 0,18 % e 1,11 %. Análise por CG-EM do óleo essencial de *M. pulegium* mostrou a isomentona e a pulegona como os constituintes majoritários da mistura, com teor de 33,6 % e 32,8 %, respectivamente. A mentona (19,7%) também foi identificada em grande percentual relativo (Tabela 10)(Fig. 20)

A mentona, isomentona e pulegona são monoterpenos oxigenados que conferem o odor característico de “menta”. O odor pungente do óleo essencial de *M. pulegium* é associado à presença da pulegona (PETRAKIS *et al.*, 2009).

Estudos dos componentes voláteis de *M. pulegium* descritos na literatura, mostram a pulegona como constituinte majoritário em amostras coletadas no Uruguai, Portugal e Irã (LORENZO *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 1998; AGHEL *et al.*, 2004). A amostra analisada, obtida de Tombos/ MG, mostra uma composição ligeiramente diferente (Tabela 11), uma vez que possui a isomentona como majoritária e em percentual bastante semelhante ao da pulegona. Este resultado aponta para uma possível variação ambiental, sazonal ou mesmo de quimiotipo.

Tabela 10- Composição química identificada no óleo essencial das folhas de *M. pulegium*:

Substâncias	IR_{lit.}	IR_{cal.}	Teor
limoneno	1030	1031	0,7
mentona	1147	1154	19,7
isomentona	1157	1164	33,6
mentol	1173	1173	3,0
pulegona	1225	1237	32,8
Total			89,8

Tabela 11- Comparação da composição química dos óleos essenciais em de *M. pulegium* estudo com aqueles da literatura (Uruguai, Lisboa e Teerã)

Substâncias	Montevideú	Lisboa	Teerã	Brasil
	Uruguai ¹	Portugal ²	Irã ³	Tombos
α -tujano	-	0,2	-	-
α - pineno	0,5	0,3	-	-
Sabineno	0,1	-	-	-
β -pineno	0,4	-	-	-
mirreno	0,3	0,8	-	-
3-octanol	1,5	-	0,8	-
limoneno	0,9	-	-	0,7
1,8-cineol	0,1	-	-	-
mentona	3,6	5,7	-	19,7
isomentona	12,9	0,6	-	33,6
mirtenol	-	0,3	-	-
neo-mentol	0,3	-	-	-
isopulegona	1,4	-	-	-
mentol	0,6	1,0	-	3,0
isomentol	0,1	-	-	-
neo-isomentol	0,8	-	-	-
α -terpineol	0,1	-	-	-
pulegona	73,4	39,5	37,8	32,8
1(7)- <i>p</i> -menta-2-one	-	-	4,9	-
carvona	-	-	0,2	-
acetato de 4-terpenil	-	-	1,0	-
carvacrol	-	-	0,3	-
piperitona	0,1	1,7	-	-
piperitenona	0,9	-	6,8	-
β -bourboneno	-	-	0,1	-
β -ioneno	-	-	0,4	-
calameneno	-	-	0,2	-
germacreno D	-	-	0,6	-
geraniol	-	0,4	-	-
isopulegol	-	17,3	-	-
acetato de geranil	-	0,2	-	-
anetol	-	0,3	-	-
<i>trans</i> -cariofileno	0,1	-	-	-
α -humuleno	0,9	-	-	-
β -cariofileno	-	1,7	-	-
óxido de cariofileno	0,3	-	1,3	-
viridiflorol	-	-	0,2	-

¹LORENZO *et al.*, 2002; ²MARTINS *et al.*, 1998; ³AGHEL *et al.*, 2004

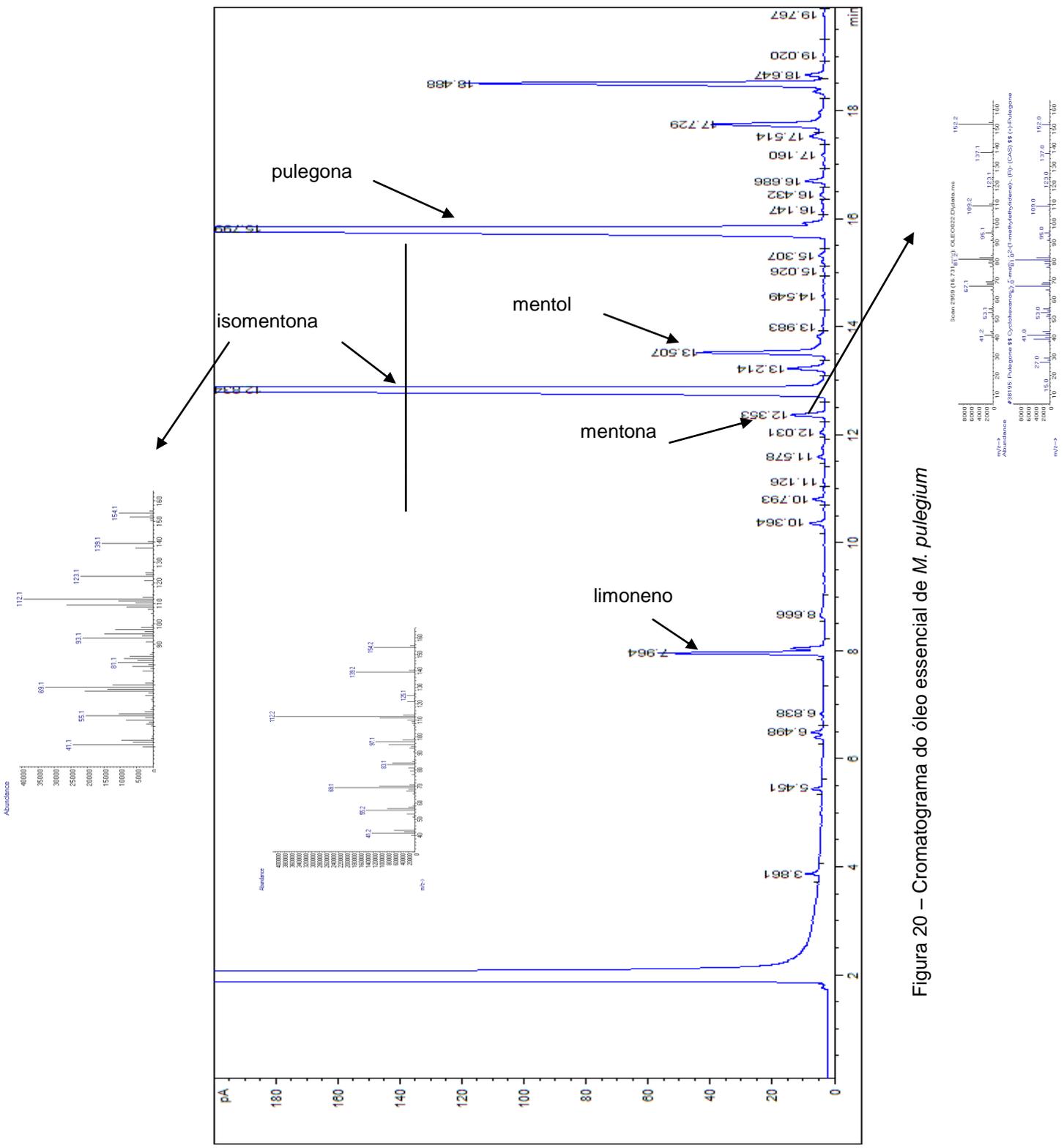


Figura 20 – Cromatograma do óleo essencial de *M. pulegium*

O aroma do óleo essencial de *H. myrtooides* e de *M. pulegium* mostrou muita semelhança, com odor característico de “menta”. A comparação da composição química desses óleos essenciais comprova a semelhança química entre eles, já que ambos apresentam a pulegona e isomentona como os constituintes majoritários e em proporções equivalentes (Tabela 12).

Tabela 12 - Comparação da composição volátil de *H. myrtooides* e *M. pulegium*

Substâncias	<i>H. myrtooides</i> Teor %	<i>M. pulegium</i> Teor %
α -pineno	0,2	-
sabineno	0,2	-
β -pinemo	0,3	-
mirceneo	0,4	-
limoneno	3,5	0,7
<i>cis</i> - β -ocimeno	0,2	-
acetato de heptanol	0,2	-
mentona	0,3	19,7
isomentona	32,7	33,6
a-terpineol	0.1	-
pulegona	44,4	32,8
acetato de isomentila	7,0	-
acetato de isopulegol	0,7	-
acetato de terpinila	0,4	-
valenceno	0,2	-
piperitona	-	2,2
β -cariofileno	-	1,2

4.2 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *O. selloi*, *H. myrtooides* e *M. pulegium*

Os óleos essenciais de *O. selloi*, obtidos a partir da segunda e terceira coletas (Região Serrana), apresentaram toxidez (*drop test*) para os microorganismos *C. albicans* tipo B ATCC 36802, *S. aureus* MRSA (BMB9393), *E. coli*, *C. neoformans*, *A. niger*, *T. rubrum* (Tabela 13). O estudo realizado com óleo essencial de *O. selloi* coletada em Ponta Grossa mostrou que este óleo essencial teve atividade moderada contra *E. coli* e *S. aureus* (FARAGO *et al.*, 2004). Isso demonstra que o óleo de *O. selloi* apresenta relativa atividade antimicrobiana, mesmo porque as cepas destes microorganismos testados são resistentes a antibióticos (Meticilina). Por isso não se descarta a possibilidade do óleo de *O. selloi* ser efetivo contra microorganismos em concentrações acima da que foi usada.

Já o óleo essencial de *H. myrtooides* foi ativo contra *L. casei*, *S. aureus* MRSA (BMB9393), *E. coli* e *C. albicans* tipo B ATCC (Tabela 14). Este resultado mostra a necessidade de se fazer mais estudos sobre a atividade do óleo de *H. myrtooides*, pois não existem dados na literatura para comprovar a eficácia do mesmo. Serão necessárias mais pesquisas com este óleo essencial aumentando a concentração acima do que foi usada no teste.

A combinação dos óleos de *O. selloi* e *H. myrtooides* na proporção de 3:1 e 4:1 apresentou toxidez para *A. niger* e *C. albicans* tipo B ATCC; na proporção 2:1 apresentou toxidez para *L. casei*, *A. niger* e *C. albicans* tipo B ATCC e os óleos na proporção 1:1 apresentou toxidez para *L. casei*, *S. aureus* MRSA (BMB9393), *E. coli* e *C. albicans* tipo B ATCC (Tabela 15). Esses dados são muito relevantes, uma vez que as cepas testadas são resistentes a antibióticos (Meticilina). Observa-se que não houve alteração na atividade dos óleos essenciais quando em combinação. A atividade antimicrobiana inicial (*drop test*) dos óleos não pode ser considerada excelente, já que alguns halos de inibição foram menores do que 1 cm. Os óleos essenciais foram combinados para aumentar a atividade antimicrobiana para melhorar o odor e sabor dos mesmos.

Considerando-se os resultados de CIM em materiais vegetais, infere-se que: inibição forte – CIM abaixo de $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$; inibição moderada – CIM entre 0,6 e $1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ e uma inibição fraca – CIM acima de $1,6 \text{ mg.ml}^{-1}$ (Duarte *et al.*, 2005).

O resultado do CIM da atividade antimicrobiana de *O. selloi* aponta para uma inibição moderada para os microorganismos *S. aureus* MRSA (BMB 9393), *L. casei* (ATCC 4646), *S. mutans* (ATCC 25175), *C. albicans* tipo B ATCC e *A. niger* (ATCC 16404). Considerando-se o microorganismo *E. coli* (ATCC 29055), o óleo essencial de *O. selloi* mostrou inibição fraca (Tabela 15).

Dados da literatura mostram que o óleo essencial de *O. selloi* que possui o eugenol como constituinte majoritário apresenta uma atividade antimicrobiana mais relevante (BURT,2004).

Tabela 13- Atividade antimicrobiana (*drop test*) do óleo essencial de *O. selloi*

Microorganismos	Óleo essencial de <i>O. selloi</i>	
	Região Serrana Novembro 2009	Região Serrana Janeiro 2010
<i>E. coli</i>	0,6	0,8
<i>S. aureus</i>	0,5	0,7
<i>C. neoformans</i>	0,9	0,9
<i>A. niger</i>	0,8	0,8
<i>T. rubrum</i>	0,8	0,7
<i>C. albicans</i>	0,8	1,0

Halo de inibição medido em centímetros.

Tabela 14 – Atividade antimicrobiana (*drop test*) do óleo essencial de *H. myrtooides* e da Associação dos óleos de *O. selloi* e *H. myrtooides*

	<i>H. myrtooides</i>	4:1	3:1	2:1	1:1
<i>L.casei</i>	0,8	0,6	0,6	0,7	0,8
<i>S.aureus</i>	1,2	0,6	0,6	0,6	0,8
<i>E.coli</i>	0,8	0,6	0,6	0,6	0,7
<i>A.niger</i>	–	0,8	0,7	0,7	0,7
<i>C.albicans</i>	1,5	1,3	1,2	1,2	1,2

Halo de inibição medido em centímetros.

Tabela 15- CIM dos óleos essenciais de *O. selloi* e *H. myrtooides*

	<i>E. coli</i> ATCC 29055	<i>S. aureus</i> MRSA BMB 9393	<i>L. casei</i> ATCC 4646	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	<i>C. albicans</i> ATCC 24433	<i>A. niger</i> ATCC 16404
	$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$					
<i>H. myrtooides</i>	>2500	2500	2500	2500	12500	2500
<i>O. selloi</i> (Madureira)	>2500	625	1250	1250	625	1250

O resultado do CIM da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *M. pulegium* e *H. myrtooides* mostrou inibição moderada para *C. albicans*, enquanto que para *O. selloi* a atividade contra este mesmo microorganismo pode ser considerada forte. Para os microorganismos *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis* todos os óleos mostraram uma inibição de crescimento moderada. No entanto, para *C. glabrata*, os óleos essenciais testados apresentaram uma inibição forte do crescimento (Tabela 16).

Estudo realizado com plantas usadas na medicina popular brasileira sobre atividade antifúngica, frente a cepas de *Candida albicans*, mostrou que o óleo essencial de *Mentha pulegium* apresentou uma inibição moderada do crescimento deste microorganismo (DUARTE *et al.*, 2005). Este resultado está de acordo com o alcançado neste trabalho. Vale lembrar que as cepas estudadas são bastante resistentes. Outro estudo feito com o óleo essencial de *Ocimum basilicum*, que também possui metilchavicol como constituinte majoritário (90%), sobre atividade antifúngica de *Botrytis fabae*, mostrou que o crescimento micelar foi inibido significativamente (OXENHAM *et al.*, 2005).

Tabela 16- CIM dos óleos essenciais de *O. selloi*, *H. myrtooides* e *M. pulegium* contra cepas clínicas de *Candida*

Amostra	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>
$\mu\text{g.ml}^{-1}$					
<i>O. selloi</i>	312,5	2500	2500	2500	78,1
<i>H. myrtooides</i>	1250	625	625	625	19,5
<i>M. pulegium</i>	625	1250	1250	1250	625
Fluconazol	1666,7	1250	416,7	625	156,2

Os óleos essenciais de *O. selloi*, *H. myrtooides* e *M. pulegium* mostraram-se eficazes contra *C. glabrata*, o que significa um excelente resultado, pois esse microorganismo é considerado um fungo patogênico de relevância, principalmente, em pacientes imunodeprimidos (KHOSRAVI *et al.*, 2011). Atualmente, *C. glabrata* ocupa o segundo ou terceiro lugar como agente causador de infecções locais (oral, esofagal, vaginal e urinárias) e sistêmicas. Esta espécie de *Candida* ocasiona esofagites em pacientes imunodeprimidos, que tem sido subestimada por falta de identificação adequada (MACÊDO *et al.*, 2008). Portanto, os óleos essenciais testados, principalmente, o de *H. myrtooides* (MIC = 19,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) podem ser importantes agentes de combate ao fungo *C. glabrata*.

C. krusei, *C. tropicalis* e *C. glabrata* foram sensíveis ao fluconazol, enquanto a *C. albicans* e *C. parapsilosis* não tiveram inibição do crescimento, mostrando assim a resistência destas cepas em relação ao fluconazol, evidenciando a importância de se estudar mais o uso de óleos essenciais como agentes antifúngicos.

4.3 Teste de estabilidade acelerado

4.3.1 *O. selloi*: Análises cromatográficas

O teste de estabilidade acelerado mostrou que a concentração relativa da substância majoritária do óleo essencial de *O. selloi*, metilchavicol, variou pouco (de 91,9 % a 75,8 %). Essa variação pode ser devido aos efeitos de volatilização da substância ou mesmo de degradação o que justificou a alteração na coloração. Observou-se, também, o surgimento de algumas substâncias a partir da segunda análise, sendo essas, *para*-anisaldeído (0,7 % a 2,8 %), 3-metoxicinamaldeído (1,4 % a 3,6 %), metileugenol (0,3 % a 0,6%), espatulenol (1,3 % a 3,4 %) e óxido de cariofileno (1,0 % a 5,9 %) (Tabela 17) (Gráfico 1).

O surgimento das substâncias *para*-anisaldeído e 3-metoxicinamaldeído pode ser explicado pela oxidação do *trans*-anetol, um isômero do metilchavicol. Assim, pode ter ocorrido isomerização do metilchavicol em *trans*-anetol e a partir desse, oxidação à 3-metoxicinamaldeído e, posterior degradação (perda de CO₂) com oxidação à *para*-anisaldeído (Fig. 21). O surgimento do metileugenol pode ser explicado pela oxidação direta do metilchavicol e posterior reação de metilação da hidroxila fenólica. De fato, essa substância tem sido detectada como a majoritária de óleos de *O. selloi* (MARTINS *et al.*, 1997). O aparecimento dos sesquiterpenos oxigenados espatulenol e óxido de cariofileno pode ser explicado pela oxidação dos sesquiterpenos originariamente presentes no óleo.

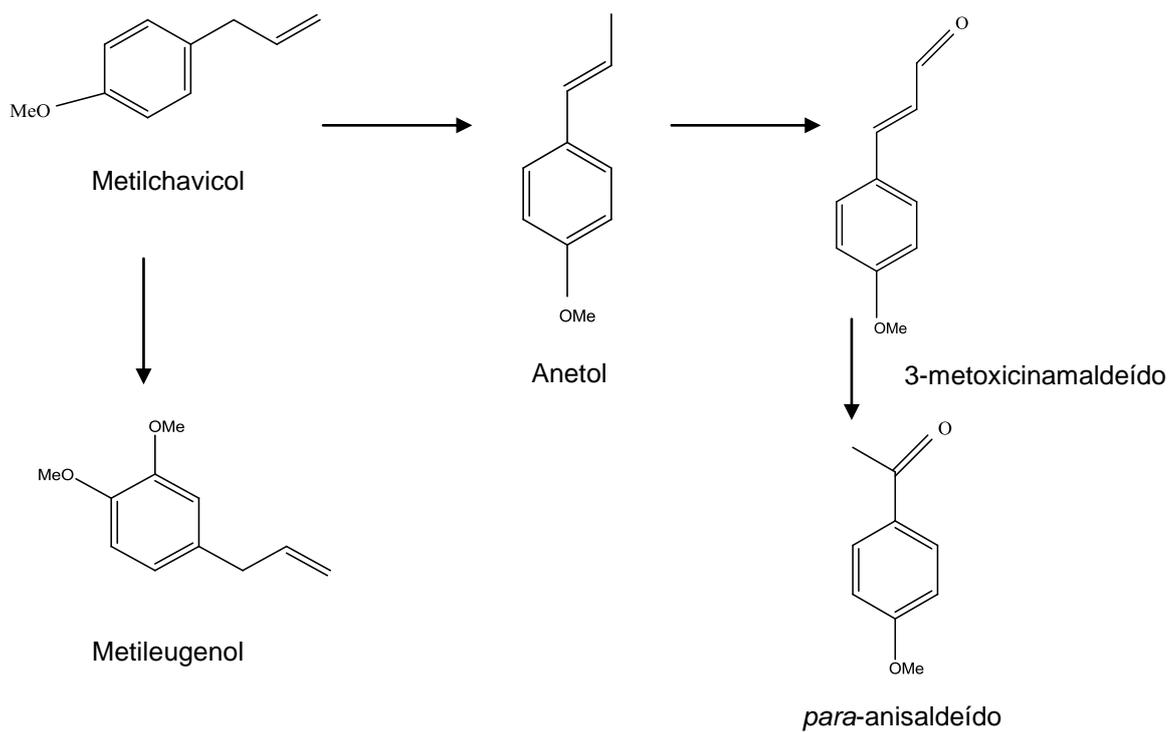


Figura 21 – Proposta de formação de substâncias por isomerização e oxidação no óleo essencial de *O. selloi*.

Tabela 17 - Tabela das análises do teste da estabilidade acelerado do óleo essencial de *O. selloi*

Constituintes Químicos	1ª Análise		2ª Análise		3ª Análise		4ª Análise		5ª Análise		6ª Análise	
	Teor %		Teor %		Teor %		Teor %		Teor %		Teor%	
	Média ± DP											
1-octenol	0,4	0,5	0,3	-	0,1	0,2 ± 0,0	0,2	0,0	0,2	-	-	-
<i>beta</i> -mirceno	0,1	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
limoneno	0,1	0,2	-	-	0,1	0,4	0,0	0,0	-	-	-	-
<i>trans-beta</i> -ocimeno	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>para</i> -mentona	0,1	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
isomentona	-	-	-	-	0,2	0,1±1,7	-	-	-	-	-	-
metilchavicol	91,9	91,3±0,2	89,6	89,8±1,8	87,0	72,1±1,0	84,9	74,2±9,3	79,5	80 ± 1,2	75,8	74,6±1,0
pulegona	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -anetol	0,2	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>para</i> -anisaldeido	-	-	0,7	-	1,0	0,4	1,6	3,4± 1,3	2,3	1,5	2,8	2,8±0,1
<i>alfa</i> -copaeno	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>beta</i> -bourboneno	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>beta</i> -elemeno	0,2	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>beta</i> -cariofileno	1,0	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>trans-alfa</i> -bergamoteno	0,1	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>alfa</i> -humuleno	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>allo</i> -aromandrendeno	0,1	0,2	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>delta</i> -germacreno	1,3	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
biciclogermacreno	1,6	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>beta</i> -bisaboleno	0,6	0,4± 0,2	0,3	-	0,2	0,3	-	-	-	-	-	-
<i>delta</i> -cadineno	0,2	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-metoxicinamaldeido	-	-	1,4	5,0± 3,1	3,6	8,9± 2,8	-	5,6± 4,8	6,9	3,5± 0,3	3,3	3,5±0,4
espatulenol	-	-	1,3	-	-	-	-	1,7± 0,6	-	2,6 ± 0,5	3,5	3,4±0,1
metileugenol	0,3	0,4	0,3	0,4± 0,1	0,3	0,6 ± 0,1	2,6	1,1± 0,3	-	0,6	-	-
óxido de cariofileno	-	-	1,0	1,3 ± 0,2	1,9	4,0± 0,1	1,0	1,8 ± 0,7	-	4,2 ± 0,2	5,9	6,4±0,5

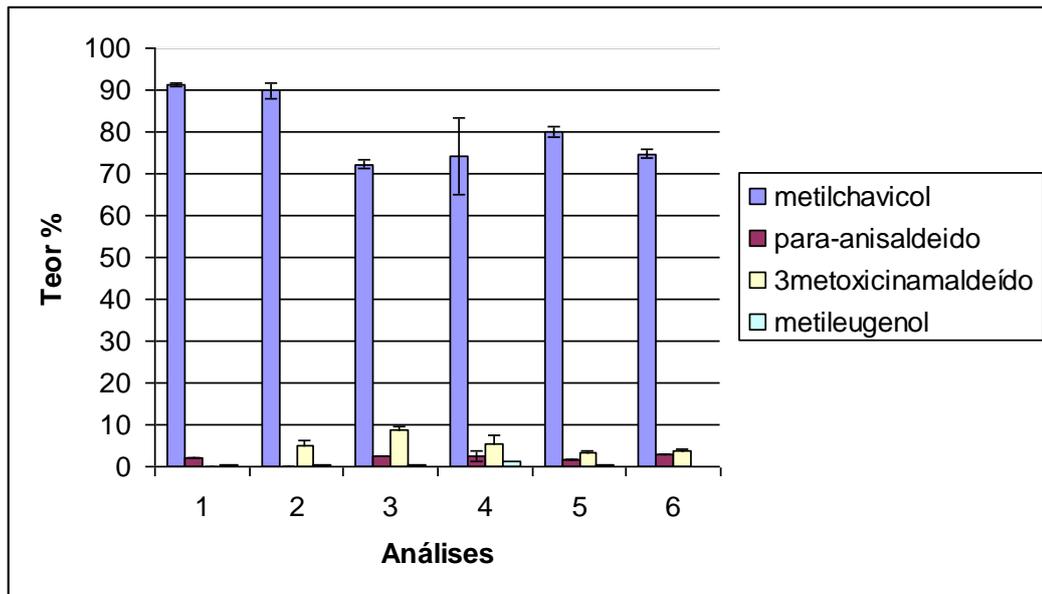


Gráfico 1 – Variação das substâncias do óleo essencial de *O. selloi*: teste de estabilidade acelerado.

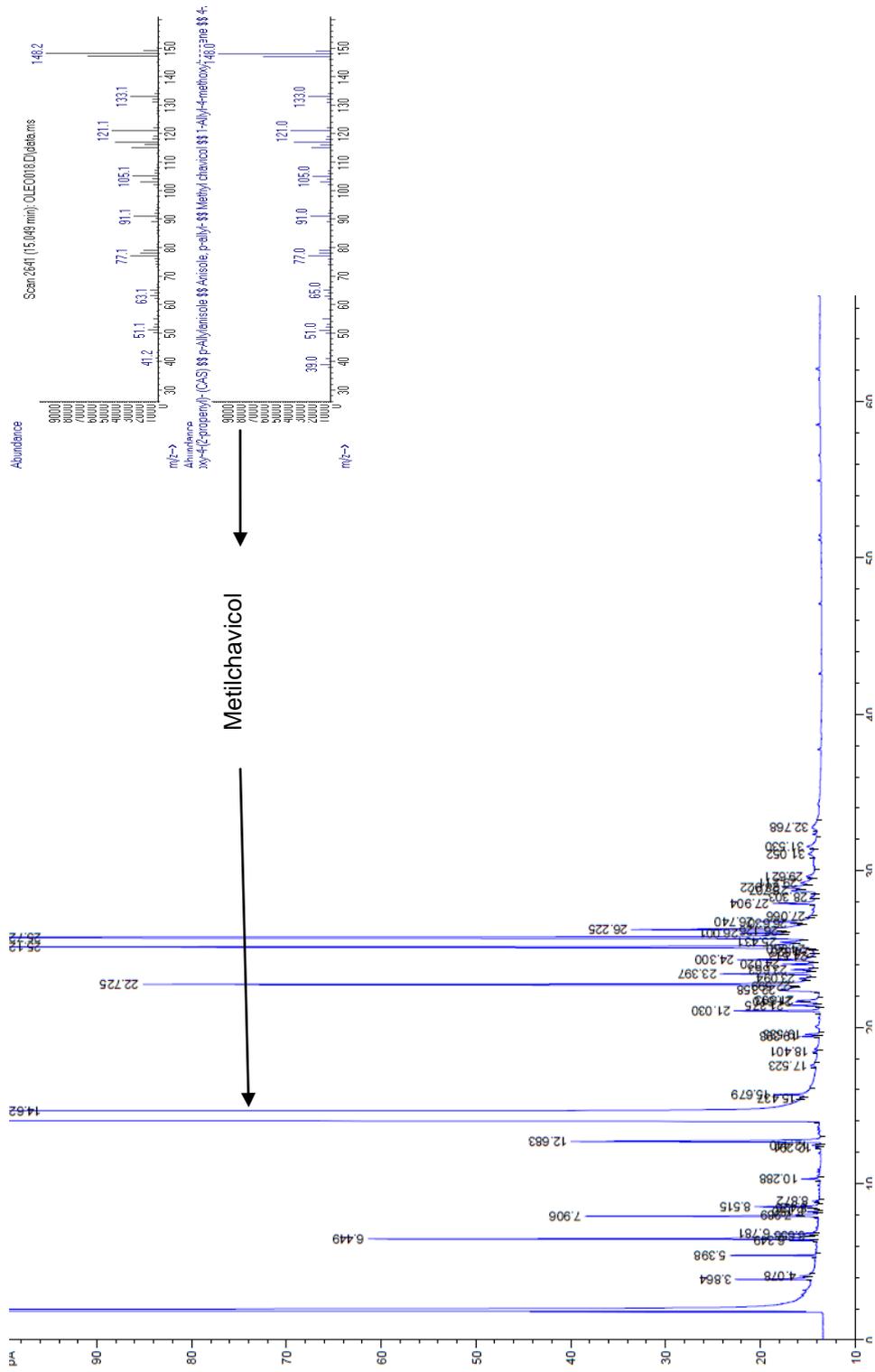
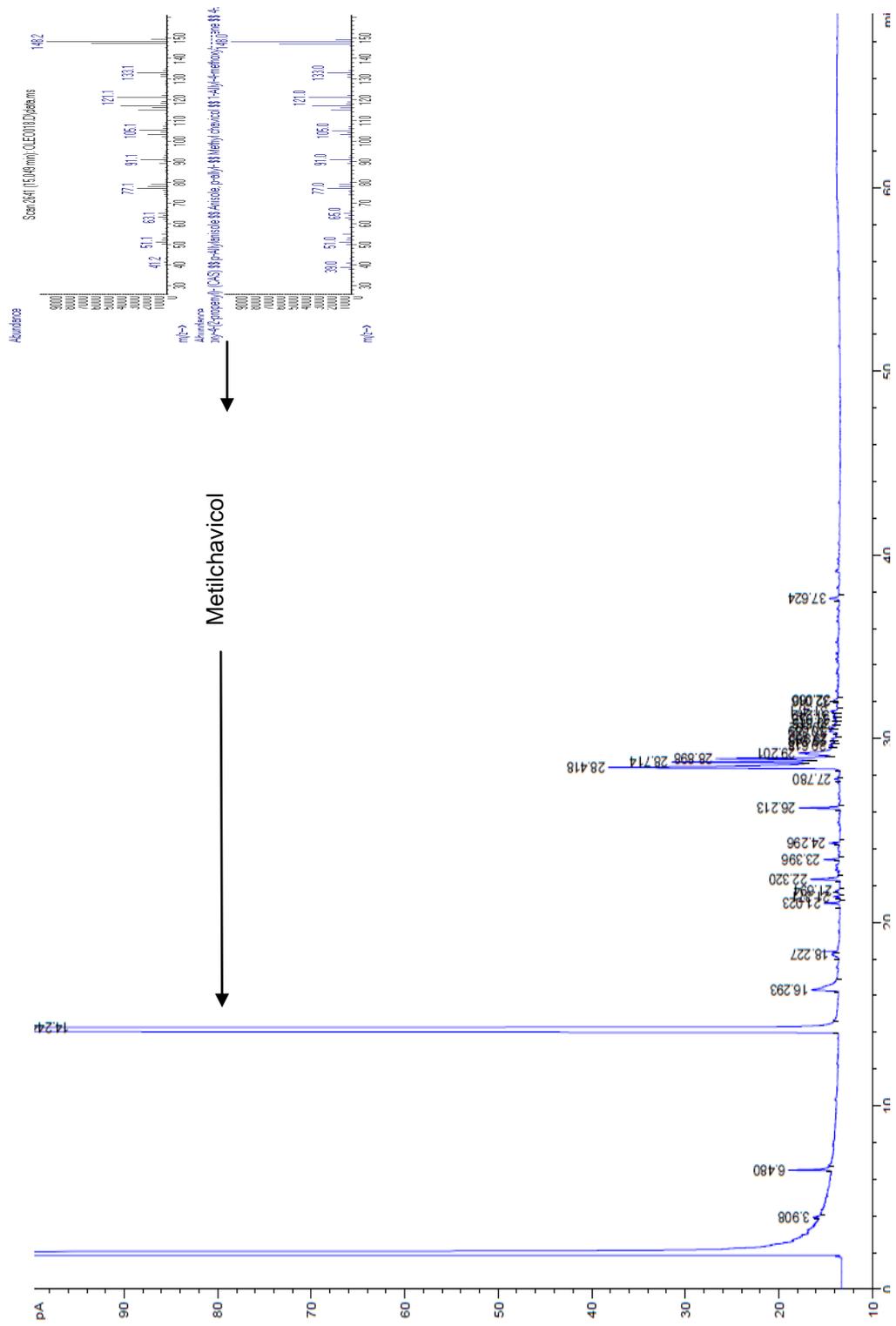


Figura 22- Cromatograma do óleo essencial de *O. selloi* -1ª análise do teste de estabilidade acelerado



Metichavicol

Figura 23- Cromatograma do óleo essencial de *O. selloi* - 2ª análise do teste de estabilidade acelerado

4.3.2 *H. myrtooides*: análises cromatográficas

Os resultados das análises de estabilidade acelerada mostraram que as substâncias majoritárias pulegona (44,2 % a 38,4 %) e isomentona (32,3 % a 30,9%) tiveram pequenas variações no teor, provavelmente, devido à volatização do óleo essencial e ao erro de quantificação da técnica. Observa-se o aparecimento de 1,8-cineol (eucaliptol) a partir da segunda análise (0,7 % a 0,6 %) (Tabela 18) (Gráfico 2). A presença dessa substância pode ser explicada pela oxidação de, por exemplo, limoneno (Fig. 24), presente na amostra. Novamente, tal qual para o óleo essencial de *O. selloi*, o surgimento dos sesquiterpenos oxigenados pode ser devido à oxidação dos sesquiterpenos originariamente presentes na mistura (DEWICK,2009).

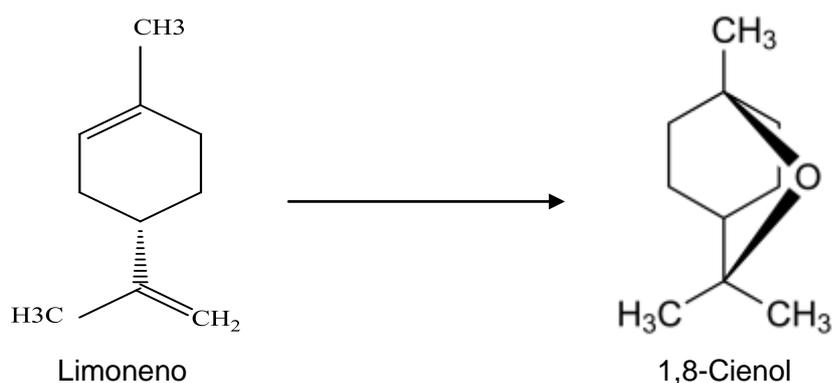


Figura 24 – Proposta de oxidação do limoneno.

Tabela 18- Tabela das análises do teste de estabilidade acelerado do óleo essencial de *H. myrtiloides*

Constituintes Químicos	1ª Análise		2ª Análise		3ª Análise		4ª Análise		5ª Análise		6ª Análise	
	Teor %		Teor %		Teor %		Teor %		Teor %		Teor %	
	Média ± DP		Média ± DP		Média ± DP		Média ± DP		Média ± DP		Média ± DP	
<i>alfa</i> -pineno	0,3	0,3	0,5	0,1	0,1	0,1	0,5	0,6±0,1	0,5	0,2	0,2	0,2
sabineno	0,2	-	0,3	-	0,1	-	0,3	-	0,9	0,1	0,1	0,1
<i>beta</i> -pineno	0,3	0,5	0,5	0,3	0,2	0,0	0,5	-	-	0,3	0,2	0,3
mirceno	0,3	0,3	-	-	-	-	0,1	1,0	-	-	-	-
<i>p</i> -cimeno	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-
<i>beta</i> -mirceno	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
limoneno	4,0	4,1	5,8	3,1	3,4	-	5,8	-	6,2	2,5 ±0,3	2,3	2,4±0,3
1,8 cineol	-	-	0,7	-	0,5	-	0,7	4,2 ±3,7	0,2	0,6 ±0,1	0,6	0,6±0,1
terpinoleno	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-
<i>trans-beta</i> -ocimeno	0,2	0,2	0,1	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
linalol	0,4	0,3±0,2	0,4	0,3	-	-	-	-	-	0,3	0,3	0,3
1-octen-3-il-acetato	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	-	-
isomentona	32,3	32,7 ±0,1	31,9	34,5 ±0,1	33,2	26,7±0,2	31,9	31,8 ±0,1	31,2	33,0 ±1,1	30,9	21,4±1,2
<i>trans</i> -isopulegona	1,1	0,2 ±0,4	0,8	0,8	-	-	0,9	-	1,1	-	-	-
mentol	3,2	3,7 ±0,4	3,0	3,2	3,0	3,5	2,8	1,1	3,4	0,9	1,0	1,0
<i>alfa</i> -terpineol	0,3	*	0	-	-	-	0,1	3,3	-	2,4 ±0,2	3,0	2,9 ±0,1
pulegona	44,2	42,3 ±0,2	42,8	37,0 ±0,1	43,7	32,9 ±0,2	41,9	39,2 ±0,1	39,3	39,7 ±0,1	38,4	38,2 ±0,1
acetato de isopulegol	6,5	6,2	6,3	8,0	7,0	8,0 ±0,3	6,5	6,9	-	-	-	-
metil acetato	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1	2,0 ±0,2	-	-
isometil acetato	-	-	-	-	-	-	-	-	6,9	-	-	-
carvona	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-
<i>alfa</i> -copaeno	0,0	0,2	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>delta</i> -pulegona	1,2	1,7	1,1	1,6	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>beta</i> -cariofileno	-	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -cariofileno	-	-	-	-	-	-	0,6	0,0	-	-	-	-
<i>alfa</i> -humuleno	0,1	-	0,1	0 ±0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
espatulenol	-	-	0,1	0,3	0,3	-	-	-	-	-	-	-
óxido de cariofileno	-	-	0,1	1,6	0,9	2,5±0,1	-	-	1,0	1,8	1,9	1,9

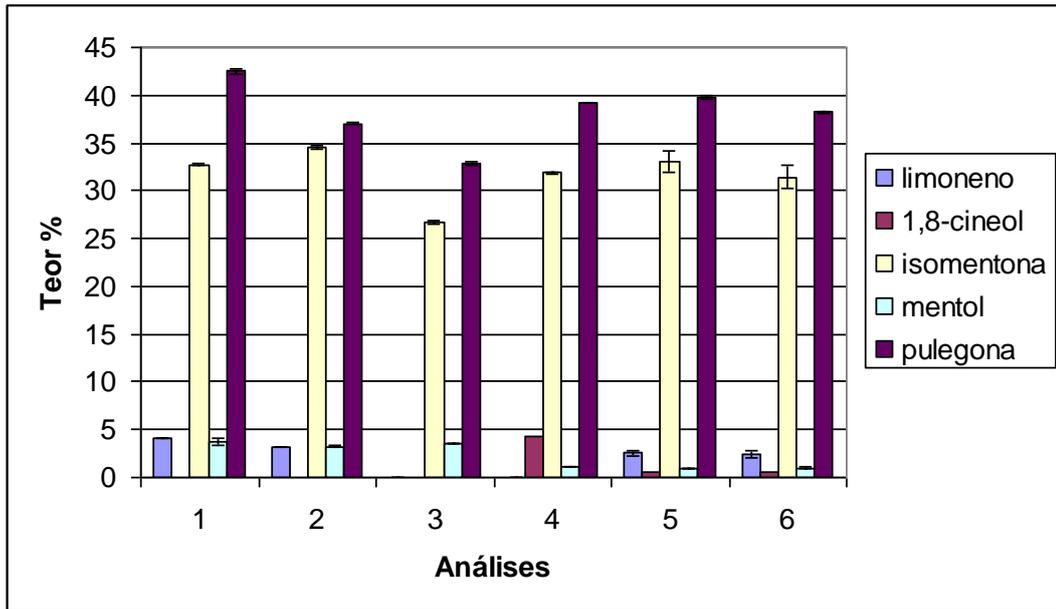


Gráfico 2 - Variação das substâncias do óleo essencial de *H. myrtooides*: teste de estabilidade acelerado.

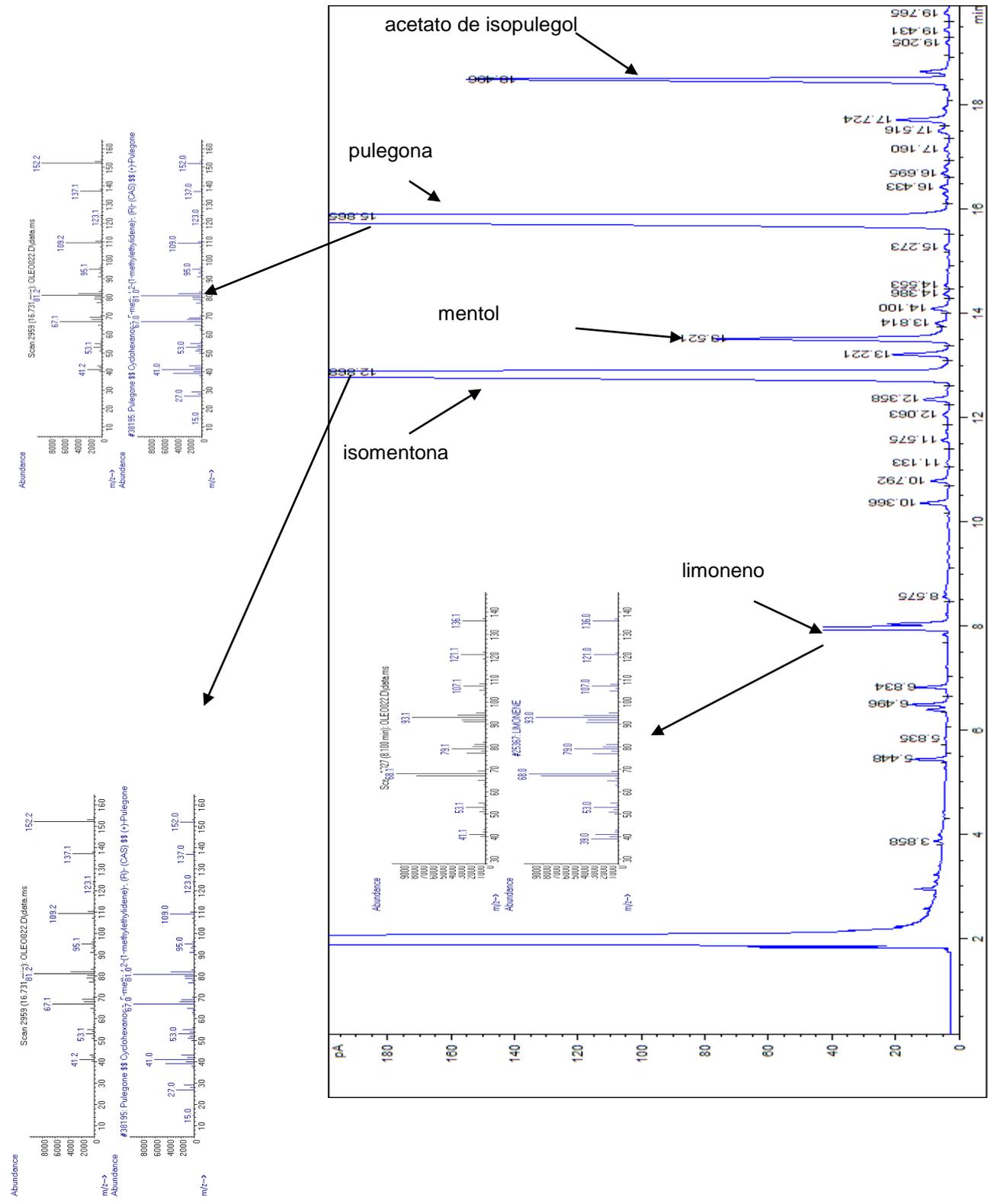


Figura 25 – Cromatograma da 1ª análise do óleo essencial de *H. myrtilloides*

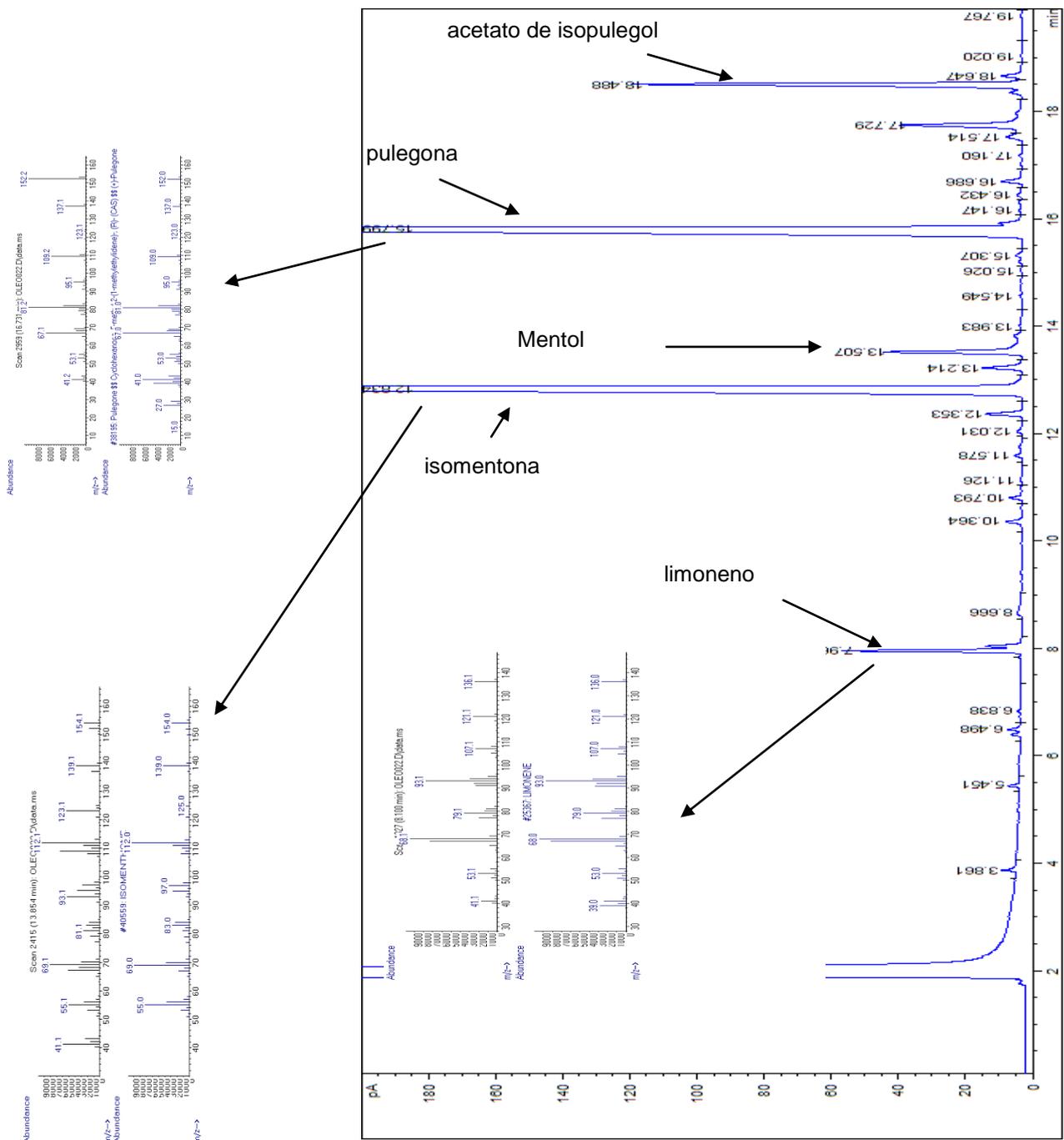


Figura 26- Cromatograma da 2ª Análise do óleo essencial de *H. myrtilloides*.

4.3.3 Características organolépticas dos óleos essenciais:

Quanto às características organolépticas, o óleo essencial de *O. selloi* passou de incolor (início do teste) para uma cor ligeiramente amarelada (final do teste). O odor do óleo essencial manteve-se de “anis” (Fig. 27).

Considerando-se o óleo essencial de *H. myrtooides*, observou-se que, a partir do terceiro mês na câmara climatizada, a amostra adquiriu uma cor levemente amarelada. O odor de “menta” manteve-se o mesmo durante todo o teste (Fig. 31).



Início: primeira análise



2ª análise



3ª análise



4ª análise



5ª análise



6ª análise

Figura 27 – Fotos das análises organolépticas do teste de estabilidade acelerado dos óleos de *O. selloi* e *H. myrtooides*

Fonte: Coleção particular do autor

5 Conclusões

A partir das análises química e microbiológica dos três óleos essenciais estudados é possível concluir que:

- ✓ Todas as amostras de *O. selloi* estudadas e que foram adquiridas tanto ao nível do mar (Rio de Janeiro) como na Região Serrana (Petrópolis), mostraram-se com alto teor de metilchavicol. Uma vez que essas amostras foram adquiridas de feiras-livres e de comerciantes que as obtiveram de cultivo próprio, pode-se supor que os cultivares provêm do mesmo acesso. A partir da comparação das análises químicas do óleo essencial de *O. selloi* publicados na literatura, é possível concluir que existem três quimiotipos para esta espécie: sendo um rico com metilchavicol, outra com alto teor de metileugenol e outro com predominância de metilchavicol e *trans*-anetol;
- ✓ A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *O. selloi* apresentou uma inibição média do crescimento para alguns microorganismos testados, demonstrando ser um bom resultado, pois as cepas testadas são resistentes a antibióticos. Quanto à atividade antifúngica, o óleo essencial de *O. selloi* apresentou um resultado muito significativo, principalmente, contra cepa clínica de *Candida glabrata*, microorganismo causador de infecções locais ou sistêmicas;
- ✓ O teste de estabilidade acelerado para o óleo essencial de *O. selloi* mostrou que este óleo é estável quimicamente, mesmo tendo a coloração modificada para amarelo. O constituinte majoritário, metilchavicol, apresentou uma pequena variação de teor nos seis meses de teste;
- ✓ A análise química do óleo essencial de *H. myrtoides* mostrou ser este rico em pulegona e isomentona;
- ✓ A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *H. myrtoides* pode ser considerada moderada. A atividade antibacteriana não ficou tão evidente, enquanto a antifúngica mostrou melhores resultados, sendo

estes de moderada a forte inibição de crescimento das cepas clínicas de *Candida*, principalmente para *C. glabrata*;

- ✓ O estudo do teste de estabilidade acelerado do óleo essencial de *H. myrtoides* mostra que este é estável, pois houve pouca variação de teor dos constituintes majoritários, pulegona e isomentana. Esta variação pode ser devido à volatilização deste óleo essencial e, ou erro de técnica. Apesar da coloração ter alterado um pouco;
- ✓ A análise química do óleo essencial de *M. pulegium* também mostrou como constituintes majoritários a pulegona e a isomentona. Este óleo essencial é relativamente diferente daqueles já publicados na literatura que mostram para *M. pulegium* grande concentração de pulegona;
- ✓ A comparação dos constituintes do óleo essencial de *M. pulegium* e *H. myrtoides* mostrou que estes são quimicamente semelhantes, o que sugere ser possível a substituição do óleo essencial de *H. myrtoides* por *M. pulegium*, já que o cultivo de *H. myrtoides* é difícil, pois o mesmo só cresce em grandes altitudes;
- ✓ A atividade antifúngica do óleo essencial de *M. pulegium* apresentou inibição moderada do crescimento de cepas clínicas de *C. albicans* e de *C. glabrata*.

O estudo químico e da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *O. selloi*, *H. myrtoides* e *M. pulegium*, principalmente da atividade antifúngica contra cepas clínicas de *Candida*, abre um campo para novos estudos desses óleos essenciais na busca de novos medicamentos para o tratamento de candidíase. A proposição de uma formulação farmacêutica com os óleos essenciais de *O. selloi* e de *H. myrtoides* apresenta-se viável, uma vez que, esses óleos mostraram-se estáveis quimicamente.

6 Referências bibliográficas

ADAMS, R.P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*, 4ª ed. Allure Publishing CO, Carol Stream, Illinois, 1995.

AGOSTINI, F., SANTOS, A.C.A., ROSSATO, M., PANSERA, M.R., SANTOS, P.L., SERAFINI, L.A., MOLON, R., MOYNA P. *Essential oil yield and composition of Lamiaceae species growing in southern Brazil*. Brazilian Archives of Biology and Technology, v.52, p. 473-478, 2009.

AGHEL, N., YAMINI, Y., HADJIAKHOONDI, A., POURMORTAZAVI, S.M. *Supercritical carbon dioxide extraction of Mentha pulegium L. essential oil*. Talanta, v. 62, p. 407-411, 2004.

AHARONI, A., JONGSMA, M.A., BOUWMEESTER, H.J. *Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants*. Trends in Plant Science, v. 10(12), p. 594- 602, 2005.

ALMEIDA, C.F.C.B.R, ALBUQUERQUE, U.P. *Check-list of the family Lamiaceae in Pernambuco, Brazil*. Brazilian Archives of Biology and Technology, v.45, p. 343-353, 2002.

ARRUDA, T.A., ANTUNES, R.M.P., CATÃO, R.M.R., LIMA, E.O., SOUSA, D.P., NUNES, X.P., PEREIRA, M.S.V., BARBOSA-FILHO J.M., CUNHA, E.V.L. *Preliminary study of the antimicrobial activity of Mentha x vilhosa Hundson essential oil, rotundifolone and its analogues*. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 16, p. 307-311, 2006.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. *Biological effects of essential oils – A review*. Food and Chemical Toxicology, v. 46, p. 446- 475, 2008.

BRASIL, 2005. ANVISA, Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005.

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

BRAMLEY, P.M. *Isoprenoid metabolism*. Plant biochemistry, v. 1, p. 417-437, 1997.

CANTINO, P.D; SANDERS, R,W. *Subfamilial classification of Labiateae*. Systematic Botany, v.11, p. 163-185,1986.

CASTRO, T.L., COUTINHO, H.D.M., GEDEON, C.C., SANTOS, J.M., SANTANA, W.J., SOUZA, L.B.S. *Mecanismos de resistência da Candida sp. WWA antifúngicos*. Infarma, v. 18, p. 30-35, 2006.

CHÁVEZ, M.M.G., ORTEGA,N.C.C., RAMOS, C.A.M., GUTIÉRREZ, S.P. *Fungicidal properties of the essential oil Hesperozygis marifolia on Aspergillu flavus Link*. Molecules, v. 16, p. 2501-2506, 2011.

Clinical Laboratory Standard Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved standard, M27-A3, Wayne, PA: Clinical Laboratory Standard Institute, 2008.

COSTA, L.C.B, PINTO, J.E.B.P.P., BERTOLUCCI, S.K.V. *Comprimento da estaca e tipo de substrato na propagação vegetativa de atoveran*. Ciência Rural, v-37, p.1157-1160, 2007.

COSTA, L.C.B, PINTO, J.E.B.P.P, CASTRO, E.M., BERTOLUCCI, S.K.V.; CORREA, R,M, REIS, E,S, ALVES, P.B., NICULAU, E.D.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, p.3173-2180, 2008.

COSTA, L.C.B, PINTO, J.E.B.P.P, BERTOLUCCI, S.K.V. , EVANGELINO, T.S. *Variação no rendimento e composição química do óleo essencial de folhas de atoveran (Ocimum selloi Benth) inteiras e moídas sob condições de armazenamento*. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 11, p. 43-48, 2009.

DAVID, E.F.S., PIZZOLATO, M., MORAIS, R., FERRI, A.F., MARQUES, M.O.M., MING, L.C. *Influência da temperatura de secagem no rendimento e composição química do óleo essencial de Ocimum selloi Benth*. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 8, p. 66-70, 2006.

DEWICK, P.M. *Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach*, 2ª ed., Inglaterra: Jonhn Wiley & Sons LTDA, p. 149, 187, 190, 193, 200- 202,210, 2009.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G. E DELARMELENA, C. *Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants*. Journal of Ethnopharmacology, v. 97, p. 305-311, 2005.

DURU, M.E., OZTARK, M., UAYUR, A., CEYLAN, O. *The constituents of essential oil and in vitro antimicrobial activity of Micromeria cilicica from Turkey*. Journal of Ethnopharmacology, v. 94, p. 43, 2004.

EISENREICH, W., SAGNER, S., ZENK, M.H., BACHER, A. *Monoterpenoid essential oils are not of mevalonoid origin*. Tetrahedron Letters, v. 38, p. 3889-3892, 1997.

FARAGO, P.V., PAULA, J.P., BITTENCOURT, J.M., ZARPELLON, V., CHECCHIA, L.E.M. *Atividade Antibacteriana de óleos essenciais de Ocimum selloi Benth.(Lamiaceae)*. Publish UEPG Biology Health Science, v.10, p. 59-63, 2004.

FARIA, J.; FERREIRA, R.S.; YASSUMOTO, L.; SOUZA, J.R.P.; ISHIKAWA, N.K.; BARBOSA, A.M. *Antifungal activity of essential oil isolated from Ocimum gratissimum L.(eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi*. Brazilian archives of biology and technology, v. 49, p. 867-871, 2006.

FRACARO, F.; ESCHEVERRIGARAY, S. *Genetic variability in Hesperozygis ringens Benth.(Lamiaceae), an endangered aromatic and medicinal plant of southern Brazil*. Biochemical genetics, v. 44, p. 479-490, 2006.

GONÇALVES, L.A., BARBOSA, L.C.A., AZEVEDO, A.A., CASALI, V.W.D., NASCIMENTO, E.A. *Produção e composição do óleo essencial de Alfavaquinha (Ocimum selloi Benth) em resposta a dois níveis de radiação solar*. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 6, p. 8-14, 2003.

HARLEY, R.M., REYNOLDS, T. *Advances in Labiate science*. The Royal Botanic Gardens, KEW, RICHMOND, UK. p.7-8, 455-468 1992.

HARRIS, B. *Research reports. The international Journal of Aromatherapy*, v. 13, p. 49-52, 2003.

HILI, P., EVANS, C.S., VENESS, R.G. *Antimicrobial action of essential oils : the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil*. Letters in Applied Microbiology, v. 24, p. 269-275, 1997.

JAZANI, N.H., GHASEMNEJAD-BERENJI, H., SADEGPOOR, S. *Antibacterial effects of Iranian Mentha pulegium essential oil on isolates of Klebsiella sp.* Pakistan Journal of Biological Sciences, v. 12, p. 183-185, 2009.

KANAFANI, Z., PERFECT J. *Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents, mechanisms and clinical impact.* Clinical and Infectious Diseases, v. 46, p. 120-128, 2008.

KHORASVI, A.R., SHOKRI, H., KERMANI, S., DAKHILI, M., MADANI, M., PARSA S. *Antifungal properties of Artemisia sieberi and Origanum vulgare essential oils against Candida glabrata isolates obtained from patients with vulvovaginal candidiasis.* Journal de Mycologie Médicale, v. 21, p. 93-99, 2011.

LEITÃO, S.G., PINTO, S.C., CASTELLAR, A., LAGE, C.L.S., SANTOS, L.H., BIZZO, H.R., LEITÃO, G.G., MARTINEZ, N., DELLACASA, E. *Análise da Composição Química do Óleo Essencial de um Poejo - Hesperozygis myrtoides Coletado em Aiuruoca (MG).* V Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais, 2009.

LEITÃO, F.S. *Plantas Medicinais Vendidas em Feiras Livres em Petrópolis e Nova Friburgo, RJ e Análise Fitoquímica de Espécies Potenciais.* **Dissertação de Mestrado** - Programa De Pós Graduação Em Biotecnologia Vegetal – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009, pp. 113.

LORENZO, D., PAZ, D., DELLACASA, E., DAVIES, P., VILA, R., CAÑIGUERRAL, S. *Essential oils of Mentha pulegium and Mentha rotundifolia from Uruguay.* Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 45, p. 519-524, 2002.

MACÊDO, D.P.C., SILVA, V.K.A.S., FARIAS, A.M.A., MELO, L.R.B., WILHEIM, A.B., NEVES, R.P. *Candida glabrata esophagitis: new cases reports and management.* Brazilian Journal of Microbiology, v. 39, p. 279-281, 2008.

MAIA, J.T.L.S., MARTINS, E.R., CASALI, V.W.D., BARBOSA, L.C.A. *Varição na composição do Óleo Essencial de Acessos de Ocimum Selloi Benth.* Revista Brasileira de Biociências, v. 5, p. 1089-1091, 2007.

MAFFEI, M.E. *Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles.* South African Journal of Botany, v. 76, p. 612-631, 2010.

MARRIOTT, C.; SHELLIE, R.; CORNWELL, C. *Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils.* Journal chromatograph, v. 936, p. 1-22, 2001.

MARTINS, R.E, CASALI, W.D.V., BARBOSA, C.A.L., CARAZZA , F. *Essential oil in the Taxonomy of ocimum selloi Benth.* Journal Brazilian Chemical Social, v. 8, p. 29-32,1997.

MARTINS, M.B.G., MARTINS, A.R. *Caracterização histological de folhas de Mentha pulegium x spicata (Lamiaceae).* Revista Brasileira de Plantas Medicinai, v. 5, p. 33-39, 2003.

MARTINS,M.M., TRIGO,R., NOLASCO, M.A., GIL, M.G.B., COSTA, M.L.B. *Influence of extraction procedure on the aroma composition of Thymus zygis L., and Mentha pulegium L.* Food Flavors: Formation, Analysis and Packaging Influences,p. 133-141, 1998.

MORAES, L.A. S, FACANALI, R. MARQUES,M.O.M, MING,C.M.L., MEIRELLES, A.M.A. *Phytochemical characterization of essential oil from Ocimum selloi.* Anais da Academia Brasileira de Ciências.,v.74(1), p. 183-186, 2001.

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

MUCCIARELLI, M., CAMUSSO, W., BERTEA, C.M., BOSSI, S., MAFFEI, M. *Effect of (+)-pulegone and other oil components of Mentha x piperita on cucumber respiration.* Phytochemistry, v. 57, p. 91-98, 2001.

MÜHLBAUER, R.C., LOZANO, S.P., PALACIO, S., REINLI, A., FELIX, R. *Common herbs, essential oils, and monoterpenes potently modulate bone metabolism.* Bone, v. 32, p. 372-380, 2003

NERIO, L.S., VERBEL, J.O., STASHENKO, E. *Repellent activity of essential oils: a review.* Bioresource Techonology, v. 101, p. 372-378, 2010.

NIIMI M., FIRTH, N.A., CANNON, R.D. *Antifungal drug resistance of oral fungi.* Odontology, v. 98, p.15-25, 2010.

OMIDBEYGI M., BARZEGAR, M., HAMIDI, Z., NAGHDIBADI, H. *Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against Aspergillus flavus in liquid medium and tomato paste.* Food Control, v. 18, p. 1518-1523, 2007.

OXENHAM, S.K., SVOBODA, K.P., WALTERS D. R. *Antifungal activity of the essential oil of Brasil (Ocimum basilicum)*. Journal Phytopathology, v. 153, p. 174-180, 2005.

PAULA, J.P.; FARAGO,P.V.; RIBAS, J.L.C.; SPINARDI,G.M.S.; DÖLL,P.M.; ARTONI, R.F.; ZAWADZKI, S.F.*In vivo Evaluation of the Mutagenic Potencial of Estragole and Eugenol Chemotypes of Ocimum selloi Benth. Essential Oil.Latin American Journal of Pharmacy, v. 26,p. 846-851, 2007.*

PEREIRA, R.C.A., MOREIRA, M.R. *Recomendações de cultivo de elixir paregórico (Ocimum selloi Benth). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Comunicado técnico 139, 2009.*

PETRAKIS, E.A., KIMBARIS, A.C., PAPPAS, C.S., TARANTILIS, P.A., POLISSIOU, M.G. *Quantitative determination of pulegone in Pennyroyal oil by FT-IR Spectroscopy*. Journal Agricultural Food Chemical, v. 57, 10044-10048, 2009.

POSER, G.L.V., MENUT, C., TOFFOLI, M.E., VÉRIN, P., SOBRAL, M., BESSIÈRE, J.M., LAMATY, G., HENRIQUES, A.T. *Essential oil composition and allelopathic effect of the Brazilian Lamiaceae Hesperozygis ringens (Benth.)Epling anda Hesperozygis rhodon Epling*. Journal Agricultural Food Chemical, v. 44, p. 1829-1832, 1996.

POZZATTI, P., LORETO, É.S., MARIO, D.A.N., ROSSATO, L.,SANTUARIO, J.M., ALVES, S.H. *Activities of essential oils in the inhibition of Candida albicans and Candida dubliniensis germ tube formation*. Journal de Mycologie Médicale, v. 20, p. 185-189, 2010.

SAAD, A., FADLI, M., BOUAZIZ, M., BENHARREF, A., MEZRIOUI,N.E., HASSANI, L. *Anticandidal activity of the essential oils of Thymus maroccanus anda Thymus broussetii and their synergism with amphotericin B and fluconazol*. Phytomedicine, v. 17, p. 1057-1060, 2010.

SARKERS, S.D., NAHAR, L., KUMARASAMY, Y. *Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals*. Methods, v. 42, p. 321-324, 2007.

SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICCK, P.R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Florianópolis, 2ed., Ed.UFSC/UFRGS, p. 387-408, 2000.

SMITH, R.L., COHEN, S.M., DOULL, J., FERON, V.J., GOODMAN, J.I., MARNETT, L.J., PORTOGHESE, P.S., WADDELL, W.J., WAGNER, B.M., HALL, R.L., HIGLEY, N.A., GAVIN, C.L., ADAMS, T.B. *A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: essential oils*. Food and Chemical Toxicology, v. 43, p. 345-363, 2005.

TELCI, I., DEMIRTAS, I., BAYRAM, E., ARABACI, O., KACAR, O. *Environmental variation on aroma components of pulegone/piperitone rich spearmint (Mentha spicata L.)*. Industrial Crops and Products, v. 32, p. 588-592, 2010.

VAN, D.D.H., KRATZ, P.D.. *A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas liquid partition chromatography*. Journal of Chromatography A, v. 11, 463-471, 1963.

VASCO, E.M.C.R., COELHO, J.A.P., PALAVRA, A.M.F. *Comparison of pennyroyal oils obtained by supercritical CO₂ extraction and hydrodistillation*. Flavour and Fragrance Journal, v. 14, p. 156-160, 1999.

WARNKER, P.H., BECKER, S.T., PODSCHUN, R., SIVANANTHAN S., SPRINGER, I.N., RUSSO, P.A.J., WILTFANG J., FICKENSCHER, H., SHERRY, E. *The battle against multi-resistant strains: Renaissance of antimicrobial essential oils as a promising force to fight hospital-acquired infections*. Journal of Ethnopharmacology, v. 97, p. 305-311, 2009.

Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th edition, Wiley Interscience, New York, 2006.