



**LUCILENE FERNANDES SILVA**

***Mentha viridis (L). L. e Mentha pulegium L.:***  
**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADES**  
**ANTIBACTERIANA, ANTIOXIDANTE,**  
**FOSFOLIPÁSICA, HEMOLÍTICA E GENOTÓXICA**  
**DOS ÓLEOS ESSENCIAIS**

**LAVRAS – MG**  
**2014**

**LUCILENE FERNANDES SILVA**

***Mentha viridis* (L). L. e *Mentha pulegium* L.: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADES ANTIBACTERIANA, ANTIOXIDANTE, FOSFOLIPÁSICA, HEMOLÍTICA E GENOTÓXICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra Maria das Graças Cardoso

**LAVRAS – MG  
2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Silva, Lucilene Fernandes.

*Mentha viridis* (L). L. e *Mentha Pulegium* L. : Caracterização química, atividades antibacteriana, antioxidante, fosfolipásica, hemolítica e genotóxica dos óleos essenciais / Lucilene Fernandes Silva. – Lavras : UFLA, 2014.

99 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Maria das Graças Cardoso.

Bibliografia.

1. Menta. 2. Estresse oxidativo. 3. Teste do cometa. 4. Pulegona.  
5. Linalol. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 547.71

**LUCILENE FERNANDES SILVA**

***Mentha viridis* (L). L. e *Mentha pulegium* L.: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADES ANTIBACTERIANA, ANTIOXIDANTE, FOSFOLIPÁSICA, HEMOLÍTICA E GENOTÓXICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2014.

Dr. Luís Roberto Batista UFLA/MG

Dr. Luiz Gustavo Lima Guimarães UFSJ/MG

Dra. Marisi Gomes Soares UNIFAL/MG

Dr. Paulo Castilho Preté UFLA/MG

Dra Maria das Graças Cardoso

Orientadora

Dra. Silvana Marcussi

Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2014**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades a mim proferidas, por todos os momentos e desafios colocados em minha vida.

À minha família, especialmente minha mãe, Terezinha Rosângela da Silva, e meu pai, João Marcelino da Silva, por todos os esforços para que eu chegasse até aqui, todos os conselhos, pelo carinho, amor, pelo incentivo em todos os momentos da minha vida e pelo apoio incondicional. Aos meus irmãos, Edilson Marcelino Silva e Wanderléia Fernanda Silva, pelo carinho, amizade, apoio e por sempre me incentivarem a continuar.

À minha orientadora, professora Maria das Graças Cardoso, pelos ensinamentos acadêmicos, pelo apoio durante todo esse tempo de convivência, pelas correções e pela amizade.

A minha coorientadora, professora Silvana Marcussi, pela disponibilidade, amizade e auxílio durante a execução dos experimentos.

À professora Josefina Aparecida de Souza, pela amizade e apoio constante.

Ao Paulo Castilho Preté, pela disponibilidade e boa vontade na condução dos experimentos, além dos momentos de descontração.

Ao professor Luís Roberto Batista, pela paciência, confiança e disponibilização do laboratório e reagentes para execução dos experimentos.

Aos amigos e colegas do laboratório, Christiane, Leonardo, Danúbia, João, Marcos, Maria Luisa, Juliana, Wilder, Rafaelas, Bruno, Alex, Rodolfo, Gabriel, Cintia e Milene, pela amizade, companherismo, apoio, além da ajuda nos experimentos.

A todos os amigos de infância, do curso, do departamento, que sempre torcem para que nossos sonhos se tornem realidade.

À Lidiany, pela amizade e apoio nos momentos decisivos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, por permitirem a realização deste trabalho, e a todos que contribuíram de alguma forma para conclusão deste trabalho.

## RESUMO

Os óleos essenciais sempre foram valorizados por suas propriedades aromáticas e terapêuticas embora poucos estudos tenham avaliado a segurança de seu uso. Realizou-se este estudo com o objetivo de caracterizar quimicamente por CG/EM os óleos essenciais de *Mentha viridis* (L.) L. e *Mentha pulegium* L., estudar as atividades antibacteriana, antioxidante, fosfolipásica e os efeitos sobre eritrócitos e DNA de leucócitos humano. Os óleos essenciais de *M. viridis* e *M. pulegium* apresentaram como constituintes majoritários linalol (40,70%), carnona (13,52%) e  $\alpha$ -terpineno (8,56%); pulegona (50,01%), mentol (31,90%) e mentona (16,56%), respectivamente. Os óleos essenciais de *M. pulegium* e *M. viridis* inibiram o crescimento das bactérias *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Choleraesuis* e *Staphylococcus aureus*. Foi observada atividade antioxidante para os dois óleos avaliados pelos métodos 2-desoxirribose e fosfomolibdênio, enquanto no poder redutor, o óleo essencial de *M. viridis* apresentou atividade antioxidante insignificante. Ambos os óleos foram capazes de inibir a quebra de fosfolipídios induzida por peçonhas de *Bothrops*, sendo observada inibição total para *M. pulegium*. Os óleos essenciais mostraram-se hemolíticos quando avaliados em meio líquido e sólido, embora o óleo essencial de *M. viridis* tenha induzido hemólise apenas nas maiores concentrações (14,6 e 29  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ). Sobre o DNA de leucócitos humanos, o óleo essencial de *M. viridis* induziu danos 3,9; 8,6 e 16,2 vezes superiores ao controle negativo, para as concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , respectivamente, contra 2,1; 2,5 e 15,8 observados para o óleo de *M. pulegium*. Os resultados obtidos ampliam a caracterização fármaco-tóxica dos óleos essenciais das espécies vegetais estudadas, destacando seu potencial de uso em indústrias fármaco-cosméticas.

Palavras-chave: Hortelãs. Estresse oxidativo. Teste do cometa. Pulegona. Linalol.

## ABSTRACT

Essential oils were always valued for their aromatic and therapeutic properties, although few studies have evaluated the safety in their use. The objectives of this study were to chemically characterize by CG/EM the *Mentha viridis* (L.) L. and *Mentha pulegium* L. essential oils, study the antibacterial, antioxidant, phospholipase activities and the effects on erythrocytes and the DNA of human leucocytes. The *M. viridis* and *M. pulegium* essential oils presented linalool (40.70%), carvone (13.52%) and  $\alpha$ -terpinene (8.56%); pulegone (50.01%), menthol (31.90%) and mentone (16.56%), respectively, as major constituents. The *M. pulegium* and *M. viridis* essential oils inhibited the growth of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella choleraesuis* and *Staphylococcus aureus* bacteria. We observed antioxidant activity for both evaluated oils by the 2-desoxyribose and phosphomolybdenum methods, while for the reducing power the *M. viridis* essential oil presented insignificant antioxidant activity. Both oils were capable of inhibiting the breaking of phospholipids induced by *Bothrops* venom, with total inhibition to *M. pulegium*. The essential oils were presented as hemolytic when evaluated in liquid and solid media, although the *M. viridis* essential oil has induced hemolysis only in higher concentrations (14.6 and 29  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ). On human leucocyte DNA, the *M. viridis* essential oil induced damage 3.9, 8.6 and 16.2 times superior to the negative control, for the concentrations of 0.25, 0.5 and 1.0  $\mu\text{m mL}^{-1}$ , respectively, against 2.1, 2.5 and 15.8 observed for the *M. pulegium* oil. The results obtained amplified the pharmaco-toxicological characterization of the essential oils of the studies plant species, highlighting its potential for use in pharmaco-cosmetic industries.

Keywords: Mint. Oxidative stress. Comet test. Pulegone. Linalool.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Rota biossintética dos metabólitos secundários em plantas.....	18
Figura 2	Biossíntese dos terpenos.....	20
Figura 3	Biossíntese dos fenilpropanoides.....	21
Figura 4	Aspecto geral da <i>Mentha pulegium</i> L.....	23
Figura 5	Aspecto geral da <i>Mentha viridis</i> (L). L.....	25
Figura 6	Reação de formação do cromóforo a partir do 2-desoxirribose	35
Figura 7	Reações para formação do ferrocianeto férrico.....	36
Figura 8	Reações ocorridas na atividade antioxidante do fosfomolibdênio.	37
Figura 9	Constituintes majoritários presentes no óleo essencial de <i>Mentha pulegium</i> L.....	59
Figura 10	Constituintes majoritários presentes no óleo essencial de <i>Mentha viridis</i> (L). L.....	61
Figura 11	Gráfico da atividade antioxidante pelo método 2-desoxirribose	67
Figura 12	Gráfico da atividade antioxidante pelo método do poder redutor	69
Figura 13	Gráfico da atividade antioxidante pelo método de redução do fosfomolibdato.....	70
Figura 14	Efeito do óleo essencial de <i>M. pulegium</i> sobre a atividade fosfolipásica induzida por peçonhas de serpentes.....	72
Figura 15	Efeito do óleo essencial de <i>M. viridis</i> sobre a atividade fosfolipásica induzida por peçonhas de serpentes.....	73
Figura 16	Atividade hemolítica de óleos essenciais em meio sólido.....	75
Figura 17	Efeito do óleo essencial de <i>M. viridis</i> , sobre a atividade hemolítica induzida pelas peçonhas de <i>L. muta</i> e <i>B. moojeni</i>	75

Figura 18	Hemólise em meio líquido dos óleos essenciais de <i>M. viridis</i> e <i>M. pulegium</i> .....	76
Figura 19	Hemólise em meio líquido dos óleos essenciais de <i>M. viridis</i> e <i>M. pulegium</i> .....	77
Figura 20	Fotos ilustrativas das classes de danos no DNA utilizadas para avaliação do ensaio cometa. A- Classe 0; B- Classe 1; C- Classe 2; D- Classe 3; E- Classe 4.....	81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Teor de umidade e rendimento dos óleos essenciais de <i>Mentha</i> .....	57
Tabela 2	Composição química do óleo essencial de <i>Mentha pulegium</i> L.....	58
Tabela 3	Composição química do óleo essencial de <i>Mentha viridis</i> L. L.	60
Tabela 4	Efeito dos óleos essenciais de <i>M. pulegium</i> e <i>M. viridis</i> sobre o crescimento de bactérias.....	63
Tabela 5	Efeito dos óleos essenciais sobre o DNA de leucócitos de sangue periférico humano.....	80

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	Metabólitos secundários.....	15
2.2	Óleos essenciais.....	16
2.3	Biossíntese de metabólitos secundários.....	17
2.3.1	Terpenos.....	19
2.3.2	Fenilpropanoides.....	20
2.4	Gênero <i>Mentha</i> .....	21
2.4.1	<i>Mentha pulegium</i> L.....	22
2.4.2	<i>Mentha viridis</i> (L).L.....	24
2.5	Bactérias.....	26
2.5.1	<i>Escherichia coli</i> .....	28
2.5.2	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	29
2.5.3	<i>Salmonella Choleraesuis</i> .....	30
2.5.4	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	31
2.6	Atividade antioxidante.....	32
2.6.1	2-Desoxirribose.....	34
2.6.2	Poder redutor do ferro.....	36
2.6.3	Fosfomolibdato.....	36
2.7	Atividades fosfolipásica, hemolíticas e genotóxica.....	37
2.7.1	Avaliação do potencial genotóxico - teste cometa.....	38
2.7.2	Potencial hemolítico e fosfolipásico.....	39
2.8	Gênero <i>Bothrops</i> .....	42
2.9	Gênero <i>Lachesis</i> .....	43
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1	Coleta e identificação das plantas.....	45
3.2	Extração do óleo essencial.....	45
3.3	Realização do teste de umidade.....	46
3.4	Identificação e quantificação dos constituintes do óleo essencial.....	46
3.5	Atividade antibacteriana.....	47
3.6	Ensaio 2-desoxirribose.....	49
3.7	Poder redutor.....	50
3.8	Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio.....	50
3.9	Avaliação da atividade genotóxica - teste do cometa.....	51
3.10	Avaliação da hemólise em meio líquido.....	54
3.11	Avaliação da hemólise em meio sólido.....	55
3.12	Avaliação da atividade fosfolipásica em meio sólido.....	55

3.13	Análise estatística.....	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1	Óleos essenciais, rendimento e caracterização química.....	57
4.2	Análise da atividade antibacteriana dos óleos essenciais....	62
4.3	Atividades antioxidantes dos óleos essenciais.....	66
4.4	Atividades fosfolipásica e hemolíticas.....	72
4.5	Atividade genotóxica.....	79
5	CONCLUSÃO.....	84
	REFERÊNCIAS.....	87

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas são utilizadas desde a antiguidade pelos povos na forma de temperos, infusões e na alimentação em geral, com o intuito de obter efeitos benéficos à saúde; os constituintes funcionais são absorvidos pelo organismo e proporcionam efeitos por meio de reações específicas. Entre tantos compostos produzidos pelas plantas, os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais que estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal (BAKKALI et al., 2008). Essas substâncias ocupam lugar de destaque em estudos atuais, pois podem oferecer os mesmos efeitos benéficos que substâncias sintéticas. Diante dos problemas causados pelas substâncias sintéticas à saúde humana e ao meio ambiente, a busca por alternativas naturais vem motivando a pesquisa nessa área. Entretanto, estudos sobre a toxicidade dos óleos essenciais ainda são pouco difundidos, sendo, portanto, necessário avaliar seus efeitos sobre células humanas, assim como suas propriedades genotóxicas, mutagênicas, teratogênicas e/ou carcinogênicas (SIMÕES et al., 2007).

Tem sido estabelecido cientificamente que os óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas, antibacterianas, atividade antioxidante, entre outras. Entre as famílias que concentram seus elementos voláteis nas folhas, destaca-se a família Lamiaceae, que possui muitas plantas de ocorrência espontânea na flora; a *Mentha viridis* (L). L. e a *Mentha pulegium* L. pertencem a essa família, e são importante fonte de compostos biologicamente ativos.

Nesse contexto, objetivou-se neste trabalho analisar a composição química dos óleos essenciais de *M. viridis* e *M. pulegium*, avaliar suas atividades antioxidante e antibacteriana, assim como testar a toxicidade e o potencial farmacológico desses óleos por meio de ensaios de indução e/ou inibição de hemólise e a degradação de fosfolípidios, assim como a avaliação da atividade

genotóxica pelo teste do cometa.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Metabólitos secundários**

A diversidade na flora que constitui o planeta é um atributo muito importante que auxilia o suprimento das necessidades da espécie humana, pois permite uma alimentação variada e balanceada de produtos agrícolas distintos e com características benéficas tanto para manutenção da vida como para o comércio desses produtos.

As plantas em geral são fonte de vitaminas, carboidratos e outras macromoléculas essenciais à sobrevivência vegetal e animal; também são fonte de metabólitos secundários, que são definidos como um amplo espectro de substâncias com funções específicas desconhecidas. Dentro da classe de metabólitos secundários, os óleos essenciais desenvolvem funções relacionadas à sua volatilidade, podendo atuar na atração de polinizadores, na proteção contra predadores e patógenos, na perda de água, no aumento de temperatura e também desempenhando funções como inibidores de germinação. Essas características tornam as plantas que os produzem poderosas fontes de agentes biocidas, principalmente com ações bactericida, fungicida e inseticida. Acredita-se que, durante o seu desenvolvimento, as plantas superiores sintetizem terpenoides essenciais para o próprio crescimento, podendo ser essa uma das funções específicas desses metabólitos. A ação dos metabólitos secundários como inibidores de germinação, proteção contra predadores, atração de polinizadores, amplia a valorização desses compostos com finalidades diversas nas plantas (KNAAK; FIUZA, 2010).

Bassolé e Juliani (2012) mostram que a maioria dos metabólitos secundários conhecidos estão envolvidos em sistemas de defesa químico das plantas devido às interações com predadores ao longo dos milhões de anos de

coevolução. O metabolismo secundário promove a produção de substâncias variadas, que vem sendo cada vez mais avaliadas tanto por suas características aromáticas quanto por seus atributos terapêuticos.

## 2.2 Óleos essenciais

Entre todos os metabólitos secundários produzidos pelas plantas, os óleos essenciais são definidos como uma mistura complexa de substâncias voláteis, odoríferas com consistência oleosa. Podem ser líquidos à temperatura ambiente, embora em alguns casos sejam sólidos ou resinosos e geralmente incolores. Podem ser sintetizados por todas as partes da planta, ou seja, botões, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, madeira e casca, sendo armazenados em diferentes estruturas secretoras. A ISO (International Organization for Standardization) define óleo essencial como um produto obtido por destilação em água ou vapor de plantas ou ainda produtos obtidos por expressão de pericarpos de frutos cítricos (SIMÕES et al., 2007). Geralmente os óleos essenciais, por apresentarem na sua constituição substâncias instáveis apresentam alta probabilidade de sofrer modificações físico-químicas devido às reações na presença de luz, oxigênio, substâncias oxidantes, redutoras, meios com pH extremos, ou meios com traços de metais que catalisam reações de decomposição e transformação.

Bandoni e Czepak (2008) constatarem que a composição química dos óleos essenciais é alterada, variando as proporções de seus constituintes ou ainda transformando um constituinte em outro. Essas mudanças ocorrem de acordo com o quimiotipo e fatores ambientais (incidência de luz, temperatura) e ainda com o desenvolvimento da planta ou fatores genéticos, como a origem botânica.

Os óleos essenciais são formados por inúmeros compostos de origens biossintéticas distintas, que vão desde hidrocarbonetos terpênicos, aldeídos,

cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas até compostos sulfurados. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações, porém, geralmente um, dois ou três deles são encontrados em proporções maiores, sendo denominados de compostos majoritários (SIMÕES et al., 2007).

De acordo com Bakkali et al. (2008), os constituintes majoritários nos óleos essenciais podem ser responsáveis pela atividade biológica, no entanto, a ação dos óleos essenciais também pode ser atribuída à ação sinérgica ou antagônica de vários componentes.

### **2.3 Biossíntese de metabólitos secundários**

Os compostos químicos nos organismos vivos são sintetizados e degradados por inúmeras reações, esse complexo sistema constitui o metabolismo. Todos os organismos possuem vias metabólicas semelhantes de produção de compostos essenciais à sobrevivência, como os carboidratos, lipídeos e proteínas; essa rede complexa de reações indispensáveis à sobrevivência é denominada metabolismo primário. Alguns vegetais e microorganismos são capazes de produzir, transformar e acumular substâncias distintas dos compostos formados pelo metabolismo primário; esse conjunto metabólico é definido como metabolismo secundário, cujos produtos, embora não necessariamente essenciais ao organismo produtor, garantem vantagens à sobrevivência e perpetuação da espécie no ecossistema (SIMÕES et al., 2007).

A síntese dos metabólitos secundários tem origem no metabolismo da glicose; os óleos essenciais são produzidos por meio de dois compostos principais, o ácido chiquímico e o acetil-CoA. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina, que irão formar os fenilpropanoides.

Os derivados do acetato produzem os terpenoides. Os terpenoides são sintetizados a partir de cinco unidades de carbono denominadas isopreno e podem ser formados tanto pela via do mevalonato quanto pela via DXPS (Figura 1) (SIMÕES et al., 2007).

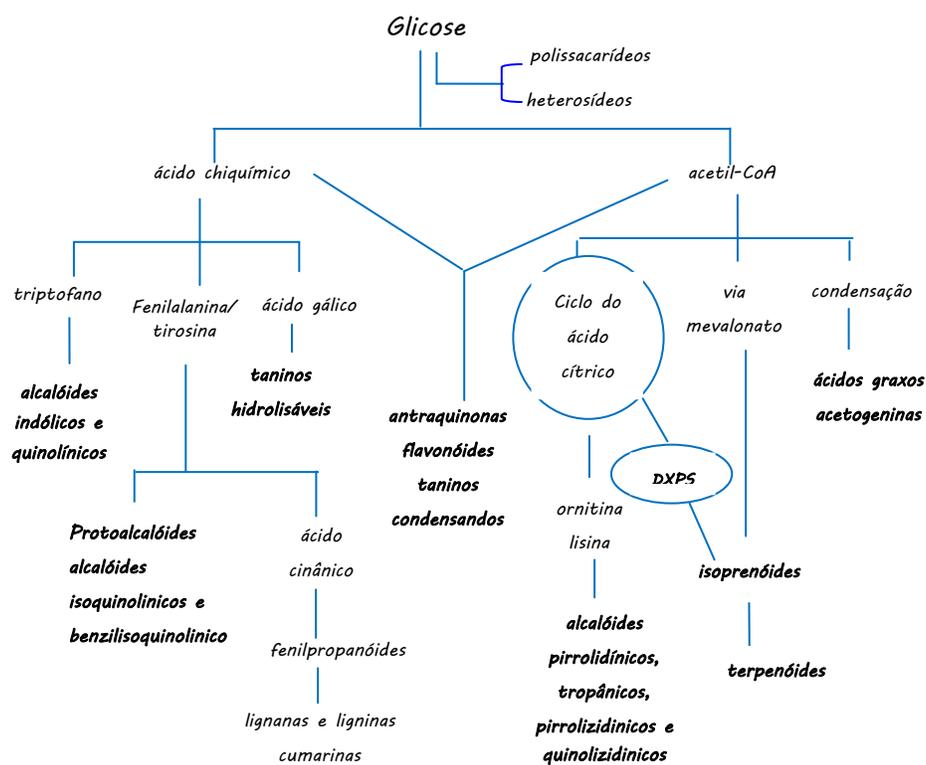


Figura 1 Rota biossintética dos metabólitos secundários em plantas  
Fonte: Simões et al. (2007).

Assim, os óleos essenciais são constituídos por terpenoides e/ou fenilpropanoides. Os principais terpenoides encontrados nos óleos essenciais podem ser classificados em monoterpenos e sesquiterpenos. Os fenilpropanoides são encontrados em menor quantidade e apresentam diferentes propriedades biológicas (BRITO, 2010).

### **2.3.1 Terpenos**

Os compostos terpênicos ocorrem em uma gama de espécies vegetais e compreendem uma classe de metabólitos secundários com uma grande variedade estrutural, são formados pela rota do ácido mevalônico ou do 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS).

Quando o ácido mevalônico é desidratado e pirofosforilado, forma-se o isopentenil difosfato (IPP) que, por meio de reações de isomerização, é transformado em dimetilalil difosfato (DMAPP). A partir do 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS), é formado o 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato, que por sucessivas reações, forma o isopentenil difosfato (IPP) e o dimetilalil difosfato (DMAPP). Por meio da condensação das unidades pentacarbonadas formadas do (IPP) e (DMAPP), ocorre a síntese de outros compostos terpênicos: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos, como mostrado pela Figura 2 (DEWICK, 2002).

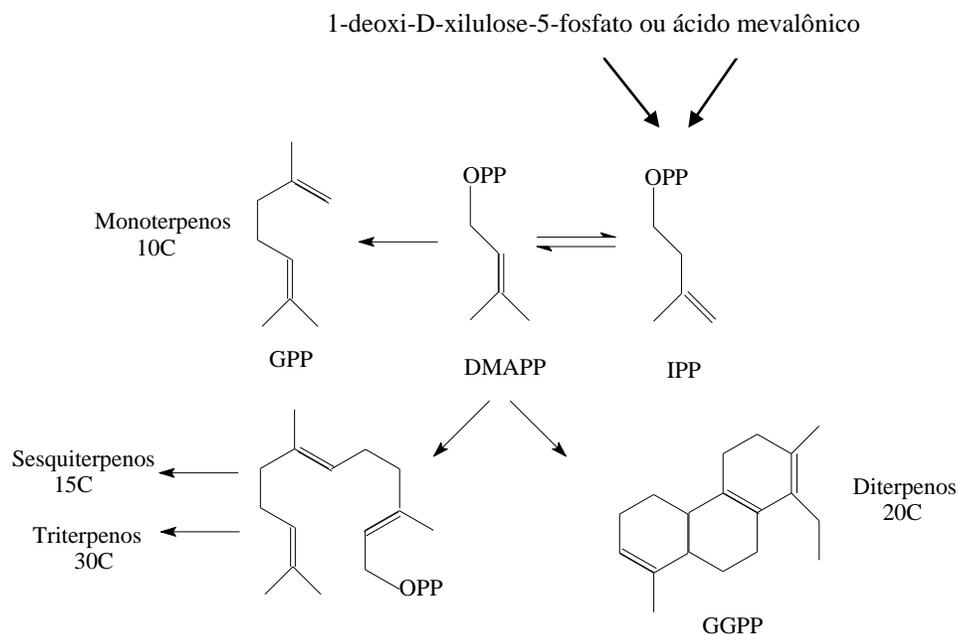


Figura 2 Biossíntese dos terpenos  
 Fonte: Adaptado de Dewick (2002).

### 2.3.2 Fenilpropanoides

Os fenilpropanoides são substâncias naturais amplamente distribuídas nos vegetais e constituídas por um anel aromático unido a uma cadeia de três carbonos e derivados biossinteticamente do ácido chiquímico. A partir do ácido chiquímico, por meio de várias reações, ocorre a formação dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, os quais são transformados em ácido cinâmico e p-cumárico, que por meio de reações de oxidação, redução e ciclização, dão origem aos fenilpropanoides (Figura 3).

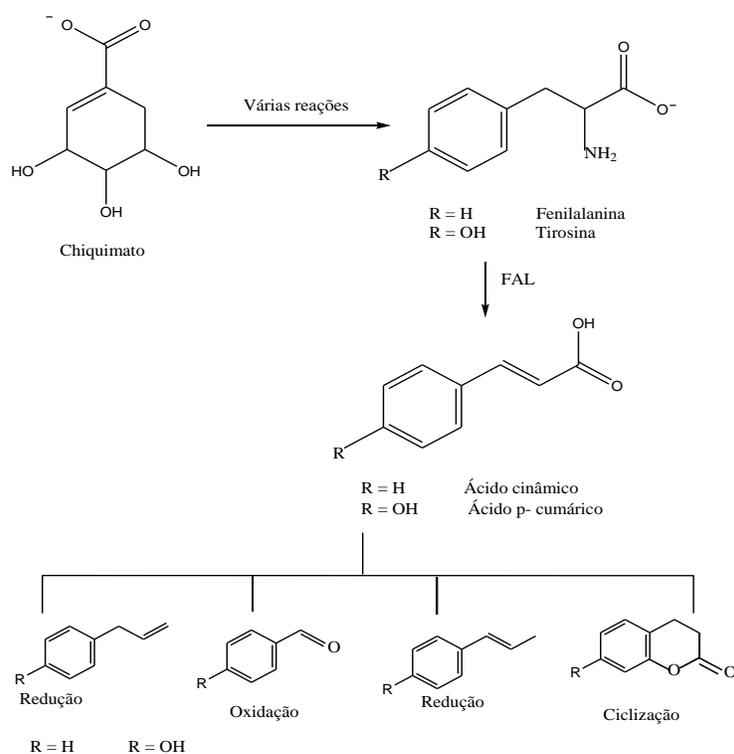


Figura 3 Biossíntese dos fenilpropanoides

Fonte: Simões et al. (2007).

## 2.4 Gênero *Mentha*

As espécies vegetais que constituem o gênero *Mentha*, pertencentes à família Lamiacea, são caracterizadas por sua complexidade, provavelmente devido aos inúmeros híbridos que podem ser formados a partir do cruzamento espontâneo das espécies. A possibilidade de inúmeros cruzamentos dentro deste gênero possibilita, portanto, o desenvolvimento de uma complexa gama de espécies, tornando a identificação trabalhosa e complexa. A maior heterogeneidade dentro desse gênero encontra-se nas regiões da Europa,

Austrália, Ásia Central e norte da África (DIMITRI, 1980). As *Menthas* são amplamente cultivadas nos cinco continentes, principalmente em regiões temperadas e subtropicadas do mundo (WANG et al., 2013).

As *Menthas*, também denominadas hortelãs, agrupam formas espontâneas e cultivadas, compreendem plantas herbáceas e geralmente perenes. As folhas podem ser sésseis ou pecioladas, opostas, serradas e suas inflorescências são pequenas, de coloração lilás ou azuladas (DIMITRI, 1980). O crescimento é rápido e geralmente suportam variações significativas nas condições agroclimáticas; contudo são mais encontradas em locais frescos, úmidos e parcialmente sombreados, podendo ser cultivadas em diversas localidades.

Devido à grande utilização industrial de substâncias extraídas destas plantas, Khanuja et al. (2000) destacam a utilização desses óleos essenciais em cosméticos, produtos farmacêuticos, alimentícios, produtos de confeitaria e bebidas alcoólicas industriais.

Segundo Santos et al. (2012), os óleos essenciais das espécies do gênero *Mentha* apresentam um elevado valor comercial, pois eles geralmente apresentam o monoterpene mentol em suas constituições, sendo o mentol amplamente usado nas indústrias farmacêutica, cosmética, de higiene pessoal e alimentícia.

#### **2.4.1 *Mentha pulegium* L.**

A espécie vegetal conhecida cientificamente como *M. pulegium* é denominada vulgarmente como poejo, poejinho, poejo-real e menta-selvagem (OLIVEIRA et al., 2011). São nativas da Europa, norte da África, Ásia e Oriente Médio, estando distribuídas principalmente em regiões temperadas e

subtemperadas. É uma planta perene, herbácea, aromática, que pode atingir até 40 cm de altura (Figura 4) (STENGELE; STAHL-BISKUP, 1993).



Figura 4 Aspecto geral da *Mentha pulegium* L.

As partes aéreas das flores de *M. pulegium* têm sido tradicionalmente utilizadas para tratamentos de sinusite, resfriado, cólera, intoxicação alimentar, bronquite, tuberculose, e também como carminativo, expectorante e diurético, destacando-se como uma importante planta aromática e medicinal. Também é relatada seu potencial antisséptico, repelente, antiespasmódico e anti-inflamatório. Boukhebt et al. (2011) mostram que o óleo essencial de *M.*

*pulegium* apresentou efeito abortivo em miométrio de rato e atividade antioxidante.

Barceloux (2008) mostra que, apesar dos efeitos benéficos observados para esses óleos essenciais, não existe aprovação para produção de medicamentos com óleo essencial de poejo, pois esses óleos essenciais são geralmente ricos em pulegona, um composto tóxico com potencial letal e efeitos hepatotóxicos (ANDERSON et al., 1996).

Boukhebt et al. (2011) indicam a presença de pulegona, mentona e isomentona como componentes majoritários.

Rodrigues et al. (2013) enfatizam a necessidade de uma melhor caracterização de plantas e preparações botânicas e de avaliação científica dos riscos de exposição dos consumidores a esses produtos. A União Europeia tem estipulado uma concentração máxima para pulegona nas concentrações de 100 mg/kg nas bebidas e 25 mg/kg em alimentos, e ainda de 250 mg/kg nas bebidas aromatizadas e 350 mg/kg nos produtos de confeitaria (COUNCIL DIRECTIVE, 1988). De acordo com Oliveira et al. (2011), a presença de pulegona, substância tóxica no óleo essencial da *M. pulegium*, incentiva estudos do uso como repelente e mostra a importância de difundir o conhecimento químico dos metabolitos secundários dessa planta visando ao seu uso seguro.

#### **2.4.2 *Mentha viridis* (L). L.**

A planta aromática cientificamente denominada como *M. viridis* é vulgarmente denominada como hortelã, e essas plantas são reconhecidas por sua utilização constante na medicina popular (BRUNETON, 1993; ADSERSEN et al., 2006). É uma planta perene, herbácea, aromática, que pode atingir até 100 cm de altura (AKDOGAN, 2003). Na Figura 5 observa-se o aspecto geral da espécie vegetal.

As folhas da espécie *M. viridis* são muito utilizadas para preparo de chás, que são tradicionalmente utilizados no tratamento da febre, dores de cabeça e distúrbios digestivos.



Figura 5 Aspecto geral da *Mentha viridis* (L.) L.

Estudos demonstram que os óleos essenciais produzidos por essa espécie apresentam efeitos antiemético, antiespasmódico, carminativo, diurético, estimulante, antialérgico, antioxidante e anticancerígeno (MKADDEM, et al., 2009).

## 2.5 Bactérias

As bactérias revestem a pele, as mucosas e cobrem o trato intestinal dos homens e dos animais, muitas delas são benéficas para seu hospedeiro, proporcionando proteção contra patógenos e doenças; contudo, há o inconveniente de existirem também bactérias danosas aos seres humanos e animais. Elas possuem um curto tempo de geração, o que as torna capazes de responder rapidamente a mudanças do ambiente e à introdução de antibióticos no ambiente bacteriano; portanto muitas vezes torna-as resistentes, devido à fácil adaptação desses micro-organismos (ARANTES; ANDRADE; BARACHO 2013).

As bactérias têm causado grandes problemas resultantes principalmente da proliferação de micro-organismos resistentes; esse fato está entre as ameaças mais graves para a saúde pública e para o sucesso do tratamento anti-bacteriano em diversos produtos industrializados. Recentemente, o aparecimento de linhagens bacterianas resistentes a antibióticos tem aumentado drasticamente. Dentro do grupo de bactérias resistentes, citam-se a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus coagulase-negativo*, *Enterococcus* sp., e *Pseudomonas aeruginosa*. Essas são algumas das principais bactérias multiresistentes a drogas (SOLORZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012).

Dentro do amplo espectro de ação que os óleos essenciais podem abranger devido ao seu grande potencial terapêutico, pode-se destacar o seu estudo contra bactérias. Diversas táticas têm sido empregadas pela humanidade com o intuito de obter produtos não contaminados por esses micro-organismos; pesquisas recentes mostram que os óleos essenciais configuram uma alternativa que vêm ganhando espaço devido ao fato de serem substâncias com baixo peso

molecular portanto, voláteis, não permanecendo no ambiente e, na maioria das vezes, apresentando baixa toxicidade para mamíferos.

Relatos de Djenane et al. (2012) demonstram que o óleo essencial de espécies pertencentes ao gênero *Mentha* apresentam atividade sobre os micro-organismos *E. Coli* e *S. aureus*.

Guimarães et al. (2014), em suas pesquisas, evidenciam que o óleo essencial de *Lippia sidoides* nativas de Minas Gerais e seu constituinte majoritário carvacrol apresentavam atividade antibacteriana sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Paralelamente a essas pesquisas, tem sido realizado estudos mais detalhados que identificam o seu mecanismo de ação (LAMBERT et al., 2001; SILVA, N., et al., 2011; HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012). Saad, Muller e Lobstein (2013), fazendo uma revisão sobre o mecanismo de ação de componentes presentes nos óleos essenciais, evidenciam a maior atividade sobre bactérias de compostos fenólicos. Esses autores confirmam que o carvacrol, eugenol e timol apresentam alta atividade contra muitos micro-organismos. Ainda revelam que grupos éster na estrutura dos constituintes aumentam a atividade contra micro-organismos. Um provável mecanismo de ação para os álcoois terpênicos e a desnaturação de proteínas encontradas nas bactérias. A presença de uma função carbonila evidencia aumento nas propriedades antibacterianas de terpenoides. Assim, o acréscimo na atividade depende do tipo de substituinte alquila. Um alceno substituinte leva a uma maior atividade antibacteriana, no que diz respeito a uma alquila substituinte. No entanto, a alquilação foi apontada como responsável pelo aumento de atividade antibacteriana de fenóis. Com base nesses dados, uma cadeia lateral alila melhora os efeitos inibitórios de um componente, especialmente contra bactérias Gram-negativas. Outro elemento que tem sido mostrado como influenciador da bioatividade dos compostos de óleos essenciais

é sua estereoquímica, podendo um isômero apresentar alta atividade e outro ser inativo contra bactérias.

Assim, pesquisas com o objetivo de explorar novos biocidas orgânicos, bem como o desenvolvimento e refinamento dos processos têm se mostrado promissoras (SINGH; SINGH, 2012).

### **2.5.1 *Escherichia coli***

A espécie *Escherichia coli*, pertencente à família Enterobacteriaceae, caracteriza-se por não apresentar esporogenicidade, ser Gram-negativa, aeróbia ou anaeróbia facultativa, capaz de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas entre 44,5 – 45 °C (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007).

Um dos principais agentes etiológicos de surtos de doenças transmitidas por alimentos é a bactéria *Escherichia coli*, principal representante do grupo dos coliformes fecais. As cepas patogênicas dos micro-organismos são responsáveis por provocarem surtos de doenças em humanos e animais, com considerável taxa de mortalidade (JAY, 2005). É conhecida pela sua capacidade de tolerar ambientes ácidos pois podem sobreviver em pH 2,5 até por 6 horas. Animais, como o gado, têm se tornado um portador assintomático de *E. coli* patogênica, o que explica a incidência dessas cepas em alimentos elaborados à base de carne, leite não pasteurizado e derivados, vegetais crus e minimamente processados (ALARCÓN, 2007).

No ano de 2011, a Alemanha sofreu uma epidemia provocada pela bactéria *E.coli* em que foram registradas 35 mortes, sendo esse o surto mais grave de contaminação por *E.coli* registrado na Europa. Em toda a Alemanha, mais de 4 mil pessoas foram contaminadas e muitos sofrerão sequelas ao longo da vida, com complicações renais e neurológicas; portanto o estudo e a busca

para solucionar os efeitos acarretados por este micro-organismo é muito importante. RASFF (2014).

### **2.5.2 *Staphylococcus aureus***

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcaceae, é formado por bactérias que exibem forma de cocos Gram-positivos, frequentemente encontradas na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Entretanto, esses micro-organismos causam desde uma simples infecção (espinhas e furúnculos) até infecções graves (pneumonia, meningite, síndrome do choque tóxico, entre outras). (SANTOS et al., 2007).

As linhagens de *Staphylococcus aureus* apresentam como característica a capacidade de desenvolver resistência a agentes antimicrobianos. A disseminação dos *Staphylococcus aureus* se deve, em parte, à grande versatilidade desse micro-organismo, pois se adaptam rapidamente a diferentes ambientes (FATTOM et al., 2004).

O grande número de infecções humanas provocadas por esse agente é uma causa importante de infecções relacionadas à assistência à saúde, uma vez que acometem a pele, sistema respiratório, ósseo, distúrbios da articulação e endovascular. Esse fato é comprovado pela contaminação de 12 pacientes internados nos Estados Unidos, no ano de 2008. Esses pacientes foram monitorados e as estripes contaminadoras de *S. aureus* apresentavam resistência à metilina (MRSA) e à linezolida (LR), antibióticos utilizados para o controle da espécie bacteriana; portanto, a introdução de novas classes de antimicrobianos comumente é necessária, pois o *S. aureus* é capaz de crescer e produzir toxina em uma ampla margem de condições ambientais e em uma variedade de alimentos (FUJIKAWA; MOROZUMI 2006).

### 2.5.3 *Salmonella Choleraesuis*

Os micro-organismos que representam o gênero *Salmonella* estão amplamente dispersos na natureza, podendo ser encontrados no trato gastrointestinal de mamíferos, répteis, pássaros e insetos (RAZAVI et al., 2008). Salmonelas são bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, pertencentes à família Enterobacteriaceae. Sua temperatura ótima de crescimento é 37 °C, multiplicam-se na faixa de pH entre 4,5 e 9,5 (D´Aoust, 2001).

A *Salmonella Choleraesuis* é um micro-organismo que apresenta propensão a invadir a corrente sanguínea (bacteremia), causando febre alta e persistente, dor no tórax, calafrios, sudorese e vômito, e o estado pode ser passageiro ou crônico (GRAY et al., 1996).

Esse gênero ainda compreende o principal causador de doenças de origem alimentar, portanto, o controle faz-se necessário e a busca de novos produtos bactericida ganha cada vez mais espaço (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007). A transmissão de *Salmonella* aos humanos ocorre pela ingestão de alimentos ou água contaminados com células bacterianas. Os alimentos de origem animal, crus ou mal cozidos, principalmente carne de frango e, em especial ovos são as fontes mais frequentes de contaminação (HUMPHREY, 2004). Amson, Haracemiv e Masson (2006), realizando levantamento relativo às doenças transmitidas por alimentos no Paraná, observaram que no ano de 1996 o número de surtos de salmonelose nessa região representava noventa e cinco dos casos de contaminação por alimentos. Setenta e cinco desses casos de contaminação foram adquiridos pela ingestão de ovos. No ano 2000, o número de casos de contaminação por salmonelose reduziu para trinta e cinco, e desses trinta e cinco casos, trinta eram referentes à contaminação através da ingestão de ovos.

As salmonelas podem provocar de febre tifoide a infecções fecais. É responsável por problema de saúde pública, tanto em países industrializados como naqueles em desenvolvimento (PAYMENT; RILEY, 2002).

#### **2.5.4 *Listeria monocytogenes***

Os membros do gênero *Listeria* podem ser encontrados tanto no solo como na água, na vegetação, na ração animal, nas fezes de animais saudáveis e de humanos, em produtos alimentícios e em plantas de processamento de alimentos.

A contaminação por *Listeria monocytogenes* resulta em listeriose, considerada grande problema de saúde pública, devido à severidade da doença, que pode causar meningite, septicemia, aborto e morte em 20-30% dos casos. (PAPARELLA et al., 2008). A investigação epidemiológica do surto de listeriose ocorrido na Carolina do Norte (EUA) identificou 12 casos em hispânicos que consumiram queijo caseiro. Em 10 dos casos, as mulheres estavam grávidas, resultando em 5 natimortos, 3 partos prematuros e 2 recém-nascidos infectados (OUTBREAK, 2001).

O gênero *Listeria* pertencente à família Listeriaceae, abrange duas espécies patogênicas para humanos e mamíferos; a *Listeria monocytogenes* e a *Listeria ivanovii* (GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005).

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva na forma de bastonete, anaeróbica facultativa e não formadora de esporo (SCHMID et al., 2005).

## 2.6 Atividade antioxidante

O estilo de vida da população, em geral, tem mudado nos últimos anos e efeitos decorrentes dessa mudança têm sido observados mundialmente. O estresse, a poluição, a má alimentação, o sedentarismo, entre outros fatores, são evidências de que os maus hábitos podem causar sérios problemas à saúde humana. Um dos efeitos acarretados por esses maus hábitos é o estresse oxidativo, definido como um desequilíbrio entre os níveis de oxidantes e antioxidantes, que conduzem a várias alterações bioquímicas e, conseqüentemente, graves distúrbios no organismo humano. O estresse oxidativo pode resultar em danos para as biomoléculas básicas, tais como lipídios, proteínas e DNA, promovendo efeitos citotóxicos e genotóxicos sobre as células (MIMICA-DUKIĆ et al., 2010).

Existem muitas espécies responsáveis por efeitos relativos ao estresse oxidativos, entre as quais podem-se citar os radicais livres, definidos como espécies que possuem elétrons de valência desemparelhados, o que os torna altamente reativos. São substâncias encontradas em todos os sistemas biológicos e geradas naturalmente nos organismos pelo processo metabólico que envolve reações de transferência de elétrons responsáveis por graves problemas celulares.

Os radicais livres (RL) têm importante função biológica, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor. Por outro lado, quando sua produção é exacerbada, ocorre uma série de processos que provocam graves danos ao organismo, podendo resultar em doenças neurodegenerativas, hipertensão, inflamação, cancro, diabetes, Alzheimer, Parkinson. São muitas das vezes considerados como os agentes responsáveis por efeitos relacionados ao envelhecimento (CHALAMAIAH et al., 2012).

Os RL originam-se de processos biológicos que normalmente ocorrem no organismo, envolvendo várias organelas celulares, como mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos, núcleo, retículo endoplasmático e membranas. As fontes exógenas geradoras de RL incluem tabagismo, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações (SOARES, 2002).

Os antioxidantes são estruturas capazes de inativar os radicais livres, podendo ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos, conforme a estrutura do agente oxidante. O sistema enzimático é composto de diversas enzimas, destacando-se a superóxido-dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). A outra parte da defesa fica por conta dos antioxidantes não enzimáticos, dentre os quais se destacam os carotenoides, a vitamina C, a vitaminas A, a vitamina E e os compostos fenólicos. De forma geral, denominam-se antioxidantes as substâncias que, presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato, por meio de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

A fim de impedir a peroxidação lipídica em produtos alimentares e farmacêuticos, muitos antioxidantes sintéticos como butil -hidroxi-tolueno (BHT), butil-hidroxi-anisol (BHA), tert- butil-hidroquinona (TBHQ) e galato de propilo (GP) têm sido utilizados. Chalamaiah et al. (2012) relatam que os riscos potenciais que os antioxidantes sintéticos podem provocar à saúde impulsiona a busca por produtos seguros; nessa perspectiva, os autores configuram os antioxidantes naturais como alternativa.

Muitos componentes produzidos pelas plantas têm sido avaliados no intuito de obter novos compostos antioxidantes, entre esses estudos tem-se avaliado o potencial dos óleos essenciais (ANDRADE et al., 2013; MIMICA-DUKIC et al., 2003; ANTÔNIO 2011; SINGH et al., 2009).

O interesse por essas substâncias obtidas de plantas tem aumentado nos últimos anos, levando as indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêuticos a terem maior atenção em novas fontes antioxidantes. Segundo Razavi et al. (2008), os antioxidantes naturais são de natureza muito variada, mas os compostos fenólicos são apontados por esses autores como responsáveis por maior capacidade antioxidante.

Miguel et al. (2010) mostram em seus estudos os mecanismos de reação primário e secundário. Os primeiros são definidos como substâncias capazes de doar um átomo de hidrogênio a um radical lipídico, formando um novo radical, que é mais estável; nos antioxidantes secundários, ocorrem reações dos antioxidantes com radicais iniciadores, inibindo as enzimas que iniciam ou reduzem o nível de oxigênio sem gerar espécies reativas.

Ruberto e Baratta (2000), avaliando a atividade antioxidante de componentes presentes em óleos essenciais, verificaram que os compostos fenólicos apresentam maior atividade antioxidante, seguido de componentes oxigenados e dos alcoóis alílicos. Nesse estudo esses autores não observaram ação antioxidante para compostos não isoprênicos e hidrocarbonetos sesquiterpênicos.

Vários métodos têm sido empregados para testar a capacidade antioxidante. Entre eles, citam-se:

### **2.6.1-Desoxirribose**

Uma das técnicas que vem sendo utilizadas para verificar a atividade antioxidante é a técnica de sequestro do radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ). Esse é um dos radicais mais prejudiciais encontrados e sua meia-vida é muito curta e dificilmente pode ser sequestrado in vivo. O método 2- desoxirribose é considerado um método simples e barato de medir a reatividade de algumas

moléculas orgânicas sobre o radical  $\cdot\text{OH}$  (ALVES et al., 2010). Esse método mede a capacidade e habilidade em tornar o radical  $\cdot\text{OH}$  inativo como mostrado na Figura 6 (BARBOSA, 2008).

Nesse ensaio a desoxirribose é degradada quando exposta ao radical hidroxil, gerado por uma mistura de  $\text{Fe}^{3+}$ , ascorbato e  $\text{H}_2\text{O}_2$  na presença de uma pequena quantidade de EDTA (etilenodiaminotetracético). Quando a mistura resultante é aquecida em condição ácida, forma-se o malonaldeído, que pode ser detectado por sua habilidade de reagir com o ácido tiobarbitúrico, formando um cromóforo róseo. Qualquer composto capaz de reagir com o radical  $\cdot\text{OH}$  compete com a desoxirribose, diminuindo a degradação do açúcar.

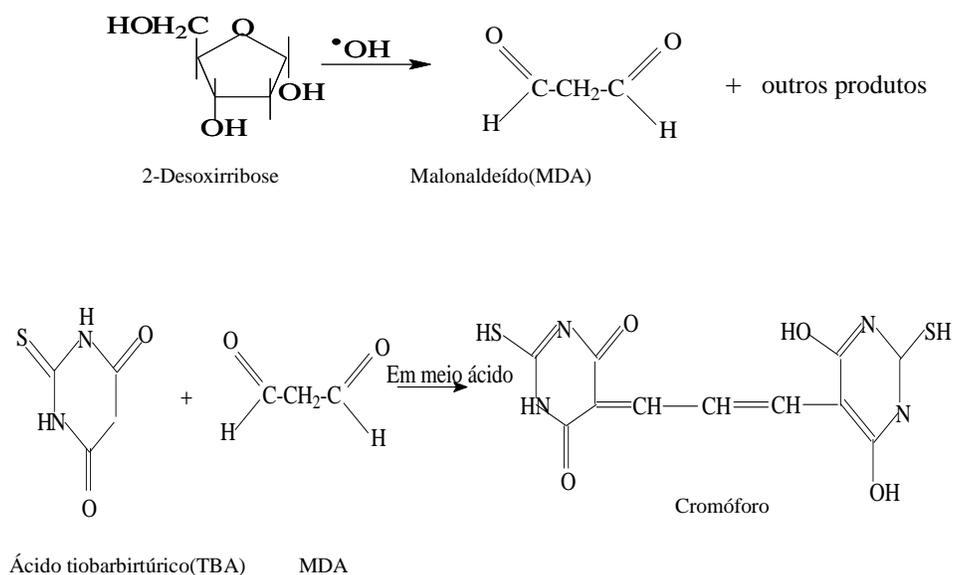


Figura 6 Reação de formação do cromóforo a partir do 2-desoxirribose

Fonte: Cheeseman, Beave e Esterbauer (1988).

### 2.6.2 Poder redutor do ferro

Esse método é baseado na medida direta da habilidade dos antioxidantes (redutores) em reduzirem em meio ácido o  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ . O princípio da atividade antioxidante é a reação de doação direta de elétrons na redução de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$  para  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]_4$ . O produto é visualizado por adição de íons livres de  $\text{Fe}^{3+}$ , que após a reação de redução, resulta na formação de complexo com coloração azul intensa,  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ , como mostrado na Figura 7 (SILVA, E., et al., 2011; BERGAMASCHI, 2010).

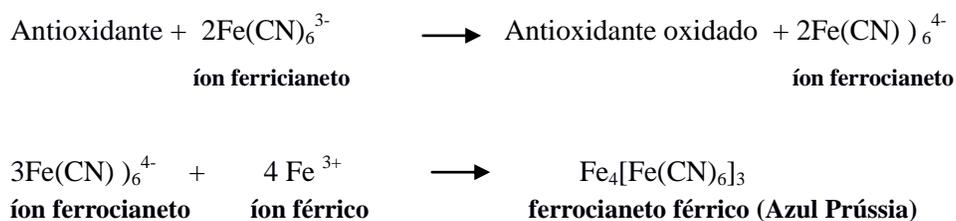


Figura 7 Reações para formação do ferrocianeto férrico  
 Fonte: Graham (1992).

### 2.6.3 Fosfomolibdato

A atividade antioxidante determinada pelo ensaio do fosfomolibdênio se baseia na redução do  $\text{Mo}^{6+}$  para  $\text{Mo}^{5+}$ , distinto por sua coloração verde em pH ácido, com absorção máxima em 695 nm. Este método se processa a temperaturas elevadas e por tempo prolongado, possuindo a vantagem de avaliar a capacidade antioxidante tanto de componentes lipofílicos quanto de compostos

hidrofílicos em meio ácido, como mostrado pela Figura 8 (LU; FOOD, 2001; PRIETO; PINEDO; AGUILAR, 1999).

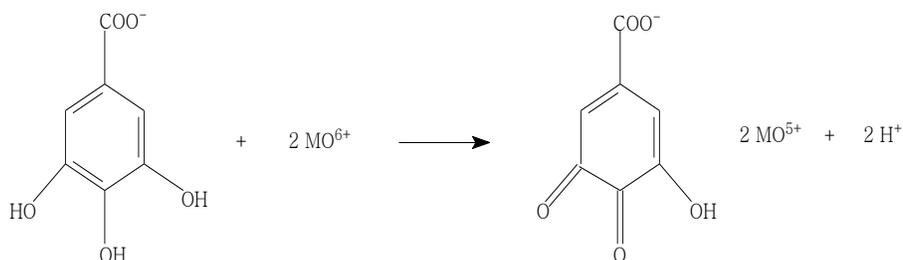


Figura 8 Reações ocorridas na atividade antioxidante do fosfomolibdênio

## 2.7 Atividades fosfolipásica, hemolíticas e genotóxica

A utilização de plantas e produtos obtidos dessas (óleos essenciais) como medicamentos tem que estar intimamente associada com a sua aplicação racional, com base na escolha apropriada dos princípios ativos, bem como a sua dosagem e os efeitos adversos associados a esses medicamentos.

Embora a divulgação para uso de produtos naturais tenha crescido muito nos últimos anos, produtos obtidos de plantas podem apresentar componentes tóxicos, hemolíticos, citotóxicos e até mutagênicos, que podem provocar reações inesperadas durante ou após seu uso (BORS et al., 2012).

A utilização de produtos naturais, mesmo de baixa toxicidade, pode induzir sérios riscos à saúde devido ao uso concomitante com outros produtos; por isso, é de extrema importância realizar estudos referentes à toxicidade de produtos naturais. A pesquisa relacionada às atividades fosfolipásica, hemolítica e genotóxica de um fitoterápico, ou um produto natural com perspectivas de uso

constitui uma medida prioritária, uma vez que vários compostos químicos podem ser capazes de causar danos ao organismo humano; portanto, experimentos capazes de fornecer, com razoável margem de segurança, indicações sobre os riscos envolvidos na sua utilização são fundamentais (BENIGNI, 2005).

### **2.7.1 Avaliação do potencial genotóxico - teste cometa**

A necessidade de realizar estudos referentes à genotoxicidade dos óleos essenciais vem se mostrando proeminente para a busca de substâncias seguras. A genotoxicidade é uma área da genética que estuda os processos que alteram o DNA. Os agentes que mudam a sequência do DNA são “tóxicos” para o gene e são chamados de genotóxicos quando a alteração é passível de correção e, portanto não se perpetua nas gerações seguintes em mais de uma geração celular. As alterações permanentes configuram processos de mutagênese, e o aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies, mas podem resultar em uma série de problemas para o organismo. Esses efeitos também devem ser avaliados para os produtos naturais (SILVA; ERDTMAN; HENRIQUES, 2003).

O ensaio cometa refere-se a um teste que fornece uma medida quantitativa de quebras no DNA, podendo ser utilizado para avaliar o potencial genotóxico do ambiente em que as células se encontram; esse teste estima os níveis de fragmentação do DNA, através de avaliação visual, permitindo, assim, inferir o quanto uma substância tem potencial genotóxico, sugerindo a necessidade ou não de sua caracterização quanto à mutagênese (AUGUSTYNIAK et al., 2014).

O ensaio cometa ou SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis Assay) é um teste que vem sendo empregado para avaliar produtos naturais, cujos resultados

podem ser utilizados como um indicativo de genotoxicidade de extratos e óleos essenciais, aumentando o conhecimento sobre as propriedades de plantas utilizadas na medicina popular (KALANTARI; AZAR; ELLIOTT, 2002; CABARKAPA et al., 2014).

Maistro et al. (2010) verificaram que o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* apresentava atividade genotóxica pelo ensaio do cometa, induzindo a fragmentação de moléculas de DNA de leucócitos do fígado de rato em todas as doses testadas.

Estudos referentes as atividades antigenotóxicas de óleos essenciais também tem sido realizados. Sinha, Biswas e Mukherjee (2011) observaram pelo ensaio do cometa que os óleos essenciais das plantas conhecidas popularmente com palmarosas e citronela não apresentavam efeito genotóxico sobre DNA de leucócitos humanos; mostravam-se ainda antigenotóxicos, reduzindo os danos às moléculas de DNA, induzidos por metanosulfonato de metila e peróxido de hidrogênio.

O ensaio do cometa é considerado uma ferramenta simples e sensível para medir os efeitos deletérios de vários agentes genotóxicos sobre o DNA, podendo ser amplamente utilizados na caracterização de produtos naturais (DHAWAN; BAYPAYEE; PARMAR, 2009; COLLINS, 2004; 2009).

### **2.7.2 Potencial hemolítico e fosfolipásico**

A ocorrência de hemólise realizada em ensaios laboratoriais pode ser diretamente correlacionada com o efeito tóxico das substâncias testadas (BRANDÃO et al., 2005). Existe um grande número de pesquisas que relacionam a investigação da atividade hemolítica ao potencial dos compostos testados em causar danos à membrana, seja pela formação de poros, seja pela sua ruptura total.

Uma característica importante da membrana dos eritrócitos é a fluidez, responsável pela determinação da viscosidade do sangue. Investigações com compostos químicos possuindo propriedades hidrofílicas e lipofílicas mostram que eles podem, muitas vezes, induzir hemólise, devido à desestabilização das bicamadas de lipídios anfipáticos que compõem as membranas celulares (SILVEIRA et al., 2006).

A ruptura intravascular dos glóbulos vermelhos (hemácias), após administração de algumas substâncias, pode elevar o nível de hemoglobina no plasma, levando à disfunção das células do endotélio vascular e resultando em trombose vascular. Quando a hemólise atinge um estado agudo, pode, além desses fatores, acarretar anemia hemolítica, que resulta em falência múltipla de órgãos, levando à morte (KINI, 2003).

Ensaio que envolvam danos às membranas celulares vêm sendo desenvolvidos com a utilização de eritrócitos sanguíneos, já que essas células apresentam altas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados, oxigênio molecular e íons ferro no estado ligado, tornando-as extremamente interessantes, pois são suscetíveis à peroxidação dos lipídios de membrana e à hemólise. A avaliação do potencial hemolítico pode ser utilizada como um modelo experimental *in vitro* para investigar os efeitos tóxicos e protetores de uma grande variedade de substâncias ou situações associadas com estresse oxidativo (NIKI et al., 1991).

Yamagushi e Veiga-Júniro (2013), estudando a atividade hemolítica de óleo essencial obtido das folhas e galhos de *Endlicheria citriodora* em eritrócitos de camundongos, em concentrações entre 1,22 e 625  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , não observaram hemólise, demonstrando que esses óleos possuem baixa toxicidade.

Oliveira 2008, estudando o efeito hemolítico do óleo essencial de *Alpinia Zerumbet* na concentração de 0,375  $\text{mg mL}^{-1}$  não observou efeito de ruptura dos eritrócitos do camundongo em estudo.

O teste da hemólise é recomendado pela ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, OMS (1998) no seu manual de controle de qualidade de produtos vegetais, além de ser requisito dos ensaios toxicológicos recomendados no Guia para Avaliação da Segurança de Produtos Cosméticos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA, 2003).

Associado aos efeitos de hemólise, também é abordada em pesquisas a degradação dos fosfolipídeos das membranas. Os estudos relativos aos efeitos tóxicos causados por produtos naturais vêm sendo ampliados com o intuito de encontrar substâncias farmacologicamente ativas e que não causem danos ao organismo.

Os fosfolipídios que formam as membranas, muitas vezes, são degradados por algumas substâncias encontradas em plantas; contudo, o efeito mais frequentemente observado é a inibição que os produtos naturais podem proporcionar aos fosfolipídios, impedindo a degradação induzida por fosfolipases de diferentes origens. Elas estão presentes em diferentes espécies animais, assim como participam no organismo humano de processos inflamatórios e resposta imune (CARVALHO et al., 2013).

A gema do ovo possui grandes quantidades de fosfolipídeos, principalmente a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina, configurando fonte de substrato acessível e de baixo custo para a detecção de atividade fosfolipásica (PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982).

Um grande número de fosfolipases catalisam a hidrólise de fosfolipídeos, liberando como produtos ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos.

Freitas et al. (2005), estudando as propriedades antiofídicas do extrato aquoso de *Casearia grandiflora* observaram que o extrato apresentou diferença na inibição das peçonhas de *B. moojeni* e *B. neuwiedi*, respectivamente. Este resultado evidencia o potencial inibidor antiofídico de plantas. Portanto, as fosfolipases presentes em peçonhas de serpentes são amplamente estudadas

devido à variedade de seus efeitos farmacológicos como, por exemplo, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, ativação ou inibição da agregação plaquetária, anticoagulação, edema, convulsão e hemorragia (FREITAS et al., 2005). As plantas medicinais e compostos isolados surgem como alternativas, na busca de inibidores da atividade fosfolipásica causada observada em acidentes ofídicos, cujas enzimas em maior abundância na maioria das espécies são as fosfolipases.

## 2.8 Gênero *Bothrops*

As serpentes que compõem o gênero *Bothrops* (família Viperidae) são divididas em 31 espécies, das quais 19 ocorrem no território brasileiro (CAMPBELL; LAMAR, 1989). A morfologia dessas espécies tem sido largamente usada para classificar e inferir relações entre espécies de *Bothrops* (GRAZZIOTIN; ECHEVERRIGARAY, 2005). Dentro desse gênero, encontram-se as espécies utilizadas como ferramentas no presente estudo *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jaracussu* e *Bothrops moojeni*, que podem apresentar uma grande variação na composição e atividades dos venenos.

Os venenos de serpentes consistem em uma variedade de misturas bioativas de proteases, fosfolipases, L-aminoácido oxidases, nucleotidasas, lectinas, peptídeos e proteínas não enzimáticas, que interagem com vários componentes do organismo e afetam os sistemas hemostáticos (GRAZZIOTIN; ECHEVERRIGARAY, 2005). Envenamentos pelo gênero *Bothrops* caracterizam-se por efeitos locais proeminentes, incluindo edema, hemorragia e necrose, que podem levar à incapacidade permanente. Manifestações sistêmicas como hemorragia, coagulopatia, choque e insuficiência renal aguda também podem ocorrer (PIDDE-QUEIROZA et al., 2010).

Borges et al. (2000) relatam que o extrato aquoso de *Casearia sylvestris*, espécie vegetal encontrada no Brasil, tinha a capacidade de inibir as atividades miotóxica, anticoagulante e indução de edema de venenos de *B. moojeni*, *B. pirajai*, *B. neuwiedi*, e *B. jararacussu* puros e também de componentes isolados.

Soares et al. (2004) relatam que 56 espécies vegetais exibiram atividade anti-inflamatória contra peçonhas de serpentes ou seus componentes isolados. Guimarães et al. (2014) relatam o grande esforço das comunidades científicas em validar o uso de plantas para o tratamento de ofidismo, agrupando em um artigo de revisão 87 compostos obtidos de extratos de 79 espécies vegetais.

O tratamento do ofidismo é ainda realizado usando a soroterapia convencional, à base de anticorpos de animais. No entanto, alguns efeitos colaterais são verificados para esses tratamentos, incluindo reações adversas na pele, trato gastrointestinal, respiratório e circulatório. Em adição, os soros antiofídicos mostram-se pouco efetivos na inibição dos efeitos locais, havendo progressão destes, mesmo procedendo à administração do soro imediatamente após o acidente. De acordo com Carvalho et al. (2013), os efeitos tóxicos causados por peçonhas podem ser reduzidos utilizando plantas ou ainda produtos obtidos destas para complementação ou mesmo substituição da soroterapia tradicional.

## **2.9 Gênero *Lachesis***

A espécie *Lachesis muta* é a maior serpente peçonhenta encontrada nas Américas, podendo atingir até 3,5 m e a única do gênero encontrada no Brasil. São popularmente conhecidas por surucucu, surucutinga e malha-de-fogo. Essas serpentes habitam florestas tropicais, dificultando, portanto, a captura ou manutenção em cativeiro. A escassez de estudos dos efeitos de seu veneno em

modelos experimentais ocorre pela dificuldade na manutenção da serpente em cativeiro (BRASIL, 2001; ROSENTHAL et al., 2002).

O veneno laquéutico possui ações proteolítica, coagulante, hemorrágica e neurotóxica, sendo essas as principais responsáveis pela gravidade das manifestações clínicas. Os sintomas caracterizam-se por edema, bolhas, necrose, distúrbios da coagulação, manifestações hemorrágicas diversas, dores abdominais e diarreia (PINHO; PERREIRA, 2001; CARDOSO et al., 2003). Embora semelhante, em relação aos efeitos, às peçonhas de *Bothrops*, acidentes com serpentes desse gênero requerem tratamento soroterápico específico, refletindo um diferencial de composição das peçonhas quanto às quantidades, estruturas e funcionalidades das moléculas presentes, principalmente enzimas.

Lomonte et al. (2009) mostraram a capacidade de extratos vegetais em neutralizar peçonhas e toxinas isoladas, incluindo neste estudo o gênero *Lachesis*. Tushar, Sarma e Rangan (2010), estudando 34 espécies de plantas pertencentes à família Zingiberaceae, observaram que apenas uma espécie apresentou atividade antiveneno, e cinco espécies utilizadas no estudo foram avaliadas com potencial anti-inflamatório. Assim, as peçonhas de serpentes têm sido também amplamente utilizadas como ferramentas laboratoriais para a indução de proteólise, atividade fosfolipásica, inflamação, hemólise, agregação de plaquetas, coagulação sanguínea, entre outros efeitos, permitindo a avaliação de potenciais inibidores obtidos de fontes naturais ou não, ampliando, assim a caracterização farmacológica e tóxica de misturas e compostos isolados. Dessa forma, a avaliação do efeito inibidor dos óleos sobre peçonhas de diferentes gêneros de serpentes permite ampliar a sua caracterização.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Coleta e identificação das plantas**

As amostras de folhas e flores de *M. viridis* e *M. pulegium* foram coletadas às 7 horas do mês de novembro de 2012, no Horto de plantas medicinais da Universidade Federal de Lavras, em um dia ameno e sem precipitação.

A cidade de Lavras localiza-se no sul do estado de Minas Gerais (Brasil), 21°14'S, longitude 45°00'W Gr. e 918 metros de altitude. As plantas foram identificadas no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras - MG. Após a identificação, as exsiccatas foram incorporadas ao acervo do Herbário ESAL, sob os números de registro 27.122 (*Mentha pulegium* L.) e 27.123 (*Mentha viridis* (L.) L.).

#### **3.2 Extração do óleo essencial**

A extração foi realizada no Laboratório de Óleos Essenciais do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras - MG. As folhas das duas espécies de *Mentha* foram pesadas e submetidas ao processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado, adaptado a um balão de fundo redondo de 6 litros, por 2 horas, para obtenção do hidrolato. Esse foi centrifugado em centrífuga de cruzeta horizontal (Fanem Baby I Modelo 206 BL) a 965,36 x g por dez minutos. O óleo essencial foi coletado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, colocado em frasco e levado à pistola de secagem para a retirada de qualquer resquício de umidade. Posteriormente, o frasco foi coberto com papel alumínio, levado à geladeira e mantido sob refrigeração até a

utilização nas análises biológicas (ANVISA, 2010). A extração dos óleos essenciais foi realizada em triplicata.

### **3.3 Realização do teste de umidade**

Para determinar a umidade do material vegetal, foi utilizado o sistema de Dean e Stark, que se baseia no princípio da imiscibilidade de solventes, no caso cicloexano e água. Foram utilizados 5 g de material vegetal picado, juntamente com 80 mL de cicloexano, para posterior determinação do rendimento do óleo presente na planta fresca. A determinação da umidade foi realizada em triplicata seguindo a metodologia descrita por Pimentel et al. (2006).

### **3.4 Identificação e quantificação dos constituintes do óleo essencial**

A análise quantitativa e a identificação dos constituintes dos óleos essenciais foram realizadas na Universidade Federal de Lavras (UFLA). As análises quantitativas e qualitativas da mistura reacional foram realizadas em um cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010, equipado com espectrômetro de massas (EM) GCMS-QP 2010 Plus, sob as seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida RTX-5MS (5% dimetilpolisiloxano) com 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm de filme, usando He como gás de arraste com fluxo de 1,18 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura inicial foi de 60 °C aumentada 3 °C min<sup>-1</sup>, até atingir 240 °C. Em seguida, aumentaram-se 10 °C min<sup>-1</sup>, até atingir 300° C, mantendo-se essa temperatura constante por 7 min; a temperatura do injetor foi 200 °C e a temperatura do detector (ou interface) de 240 °C. Foi injetado um volume de 1 µL da mistura reacional dissolvida em diclorometano. As condições do detector foram de captura iônica operando por impacto eletrônico e energia

de impacto de 70 eV; velocidade de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos/s e fragmentos detectados na faixa de 45 a 500 Da.

### 3.5 Atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Os micro-organismos utilizados foram *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella Choleraesuis* ATCC 6539 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

Durante o experimento, os micro-organismos foram mantidos em tubos contendo meio de congelamento, sob refrigeração (4 °C) (TEBALDI, 2008). Para a ativação das culturas bacterianas, as cepas foram repicadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e ficaram incubadas a 37 °C, por 24 horas, para a obtenção do inóculo.

Após a ativação da suspensão bactérias, 300 µL desse meio foram transferidos para um tubo contendo 5 mL de Caldo Peptona de Caseína e soja (TSB). Os tubos foram novamente incubados a 37 °C, até alcançar a turbidez de referencia uma solução-padrão de McFarland de 0,5, o que resulta numa suspensão contendo aproximadamente de 1 a 2 x 10<sup>8</sup> UFC/mL. A densidade correta do controle de turbidez foi verificada utilizando-se um espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1 PC), no comprimento de onda de 625 nm, em que a absorbância ocorreu entre 0,08 a 0,10, valor recomendado por National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS (2003).

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais foi determinada pela Técnica de Difusão em Cavidade Ágar, empregando-se, para tal, o ágar TSA (Tryptic Soy Agar) para *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e, para as demais

espécies, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella Choleraesuis* ATCC 6539 foi utilizado Ágar Mueller-Hinton (PEREIRA et al., 2008).

Inicialmente, uma fina camada de ágar foi adicionada em placas de Petri (140 mm de diâmetro). Após a solidificação, esferas de vidro estéreis com 4 mm de diâmetro foram posicionadas sobre o meio sólido. Alíquotas padronizadas de culturas de *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella Choleraesuis* ATCC 6539 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 foram transferidas para frascos de vidro contendo 90 mL de ágar Mueller-Hinton e TSA respectivamente, obtendo-se concentração de  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> na cultura reveladora. O meio ainda líquido foi vertido sobre a camada anterior.

Após a solidificação do Agar ou TSA, as esferas de vidro foram retiradas com auxílio de pinças estéreis, com posterior deposição do óleo essencial nos poços formados. As diluições foram realizadas em solução de dimetilsufóxido (DMSO), nas proporções de 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64 e 1:128 partes de solução adicionada de partes de óleo essencial como diluição, obtendo-se as concentrações 500; 250; 125; 62,5; 31,3; 15,6; 7,8 e 3,9 µL mL<sup>-1</sup>. Foram aplicados nos poços 10 µL do óleo essencial diluído. As placas foram incubadas em BOD 37 °C por 24 horas e medidos os diâmetros dos halos de inibição formados. Foram realizadas três repetições para cada tratamento, uma testemunha relativa com a aplicação de 10 µL de DMSO; como padrão de comparação, foi utilizada uma solução de 1000 µg mL<sup>-1</sup> do antibiótico cloranfenicol (CL) (OGUNWANDE et al., 2005).

A partir dos diâmetros obtidos, que evidenciaram a sensibilidade do micro-organismo, avaliou-se o perfil da sensibilidade das bactérias em diferentes concentrações dos óleos essenciais. A concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como a menor concentração de óleo essencial em que ocorreu a presença de halo de inibição.

### 3.6 Ensaio 2-desoxirribose

A avaliação da atividade antioxidante sequestradora do radical hidroxil foi determinada pela diminuição da formação de substâncias reativas pelo TBA (ácido tiobarbitúrico) provenientes da degradação do açúcar desoxirribose pelo radical hidroxil (HALLIWEEL; GUTTERIDGE; ARUOMA, 1987). Foram preparadas soluções dos óleos essenciais nas concentrações de 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 150; 200; 250; 500 e 750 e 1000  $\mu\text{L mL}^{-1}$  em água. As misturas reacionais foram preparadas em tubos de ensaio contendo 50  $\mu\text{L}$  da amostra, 100  $\mu\text{L}$  do Mix Fe-EDTA, 100  $\mu\text{L}$  de desoxirribose, 680  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 e 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , incubados por 2 horas em banho maria a 37 °C. Para terminar a reação, foram acidionados 500  $\mu\text{L}$  de TCA (ácido tricloroacético) e 500  $\mu\text{L}$  de TBA; os tubos foram fervidos por 10 minutos. Para o branco foram adicionados todos os reagentes, menos a desoxirribose; para o controle, foram adicionados todos os reagentes exceto a amostra; também foram realizados teste para comparação com manitol açúcar utilizado para redução de edema cerebral, hipertensão, entre outras doenças.

As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro Shimadizu UV-1601PC, a 527 nm.

A atividade antioxidante foi determinada pela equação matemática expressa abaixo:

$$\text{Equação 1: \%AA} = 1 - [(As \times 100)/Ac]$$

Em que: %AA = porcentagem de atividade antioxidante,

As = Absorbância da amostra

Ac = Absorbância do controle

Para obtenção do IR<sub>50</sub>(Inibição radicalar), foram plotados gráficos com os valores de %AA (porcentagem de atividade antioxidante) *versus* as concentrações analisadas.

### 3.7 Poder redutor

Esse teste foi realizado pela medida colorimétrica em 700 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV-1601PC. Para a medida da atividade, 50 µL das diferentes concentrações dos óleos (0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 150; 200; 250; 500 e 750 e 1000 µL mL<sup>-1</sup>) em etanol foram adicionadas a 500 µL do tampão fosfato 200 mM, pH 6 e 500 µL de hexacianoferrato (III) de potássio 1%. A mistura foi agitada e incubada por 20 minutos a 50 °C. Após esse período, foram adicionados 500 µL de TCA, 1500 µL de H<sub>2</sub>O e 300 µL de FeCl<sub>3</sub>. Repetiu-se o procedimento com excessão da amostra, para obter o controle e, no branco, havia somente a presença de etanol.

Para a determinação da atividade antioxidante, foi construída uma curva da absorbância versus a concentração da amostra.

O BHT foi utilizado como controle positivo e as análises realizadas em triplicata com os resultados apresentados pela média (KANATT; CHANDER; SHARMA, 2007).

### 3.8 Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio

As soluções dos óleos essenciais nas diferentes concentrações (0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 150; 200; 250; 500; 750 e 1000 µL mL<sup>-1</sup> diluídas em etanol) foram adicionadas no volume de 50 µL à solução reagente do complexo fosfomolibdênio 2 mL (Ácido sulfúrico 10%, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM ) e incubados por 60 minutos a 95 °C. Após

resfriamento, procedeu-se à leitura em 695 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV-1601PC, a 527 nm. O etanol foi utilizado como branco e, para o controle, substituiu-se a amostra pelo solvente etanol. A capacidade antioxidante dos óleos foi expressa em relação ao ácido ascórbico (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

Foram feitas curvas analíticas de treze pontos com ácido ascorbico (0,78 a 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), além de teste para comparação com BHT, antioxidante sintético.

Os cálculos foram realizados a partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições (treze concentrações) dos óleos, plotando um gráfico para os óleos essenciais e o BHT, com absorbância no eixo Y e a concentração correspondente a cada diluição ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) no eixo do X, determinando-se a equação da reta. Substituiu-se, então, nessa equação, a absorbância correspondente a 1.000  $\mu\text{g L}^{-1}$  do padrão de ácido ascórbico, encontrando-se assim (x), a concentração da amostra ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) equivalente a 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de ácido ascórbico. O resultado final foi calculado pela divisão de 1000 pelo valor de x (g) e multiplicado por 1 g, que foi expresso em  $\mu\text{g g}^{-1}$ . (RUFINO et al., 2007).

### **3.9 Avaliação da atividade genotóxica - teste do cometa**

Os protocolos experimentais foram submetidos à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (COEP) da Universidade Federal de Lavras estando o início das análises envolvendo sangue, condicionadas a aprovação pelo COEP e consentidas com o número de registro 17935713.8.0000.5148.

As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Lavras.

O sangue utilizado nos experimentos foi coletado com material descartável. Os voluntários convidados foram alunos de idade entre 18 e 35 anos (homens e mulheres), que não faziam uso contínuo de medicamentos (ex: pessoas com hipertensão ou diabetes), não fumantes, não trabalhavam em condições de risco químico ou biológico e possuíam um histórico de boas condições de saúde para os últimos 3 meses. Os potenciais voluntários também não poderiam ter sido submetidos a qualquer procedimento cirúrgico e/ou administração de medicamentos de tarja preta (ex: quimioterápicos e antibióticos) ou outras drogas que poderiam causar alterações nas células sanguíneas, invalidando os experimentos do projeto proposto.

Para o teste do cometa, foi utilizada a metodologia de Singh et al. (1988), conforme descrita a seguir. Os testes foram realizados a partir de sangue total, com posterior análise apenas dos leucócitos isolados durante o tratamento das lâminas. Foram coletadas alíquotas de 5 mL de sangue de cada voluntário, sendo utilizados 5 voluntários.

As células permaneceram na presença dos tratamentos (0,6  $\mu\text{L}$  das diluições dos óleos essenciais de *M. viridis* e *M. pulegium*, nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) por período de 3 horas. Foi necessária uma suspensão celular com aproximadamente  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  para trabalhar com 5 a 10.000 células por lâmina, embora a avaliação constitua apenas em 300 nucleoides por tratamento, 100 nucleoides/lâmina.

A solução de lise (NaCl 0,25 M; EDTA 100 mM; Tris 10 mM; pH 10 ajustado com NaOH 10 M; 1% Triton X-100; 5% DMSO) foi preparada e mantida a 4 °C. A agarose de baixa temperatura de fusão 1% (LMP) foi derretida em micro-ondas e transferida para banho-maria a 37 °C. As luzes do laboratório permaneceram apagadas durante os passos seguintes, em que 10  $\mu\text{L}$  de cada solução de incubação foram transferidos para microtubos contendo 100  $\mu\text{L}$  de agarose LMP. A mistura foi homogeneizada e colocada sobre as lâminas

previamente cobertas com agarose NMP 1,5% (temperatura de fusão normal), sendo essa coberta com lamínula. As lâminas permaneceram na geladeira por 10 minutos, as lamínulas foram então retiradas e as lâminas mergulhadas na solução de lise recém-preparada, permanecendo nessa solução por, no mínimo, 2 horas. Como controle positivo (C+), foi utilizada a doxorubicina ( $100 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ).

As lâminas foram removidas da solução de lise e mantidas em solução de eletroforese (EDTA 1 mM; NaOH 300 mM; pH 13) por 20 min a  $4^\circ\text{C}$  antes de serem transferidas para o recipiente apropriado para a corrida eletroforética, para o relaxamento das moléculas de DNA e exposição dos sítios álcali-lábeis. Após a corrida, as lâminas foram colocadas em uma solução de neutralização (Tris-HCl 0,4 M; pH 7,4) por 25 min. O DNA contido nas lâminas foi precipitado com etanol 100% por 5 min, e seco à temperatura ambiente. A coloração foi realizada com iodeto de propídio a  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Os padrões do cometa foram analisados por escores visuais. De acordo com Collins et al. (1997) e adaptações de Marcussi et al. (2011), os nucleóides foram analisados por escore visual e classificados quanto aos níveis de fragmentação, sendo considerados pelo avaliador o tamanho da cabeça e da cauda e a intensidade de fluorescência em ambos. Dessa forma, as classes consideradas foram classes 0 (dano < 5%), 1 (5 – 20%), 2 (20 – 40%), 3 (40 – 85%) e 4 (dano > 85%). Porcentagens de danos foram calculadas pela somatória dos nucleóides classificados de 1 a 4. Unidades Arbitrárias (U.A.) também foram apresentadas, sendo calculadas conforme descrito por Collins et al. (2004), em que  $1 \times N1 + 2 \times N2 + 3 \times N3 + 4 \times N4$ . Os valores N1, N2, N3 e N4 são os números de nucleóides após o cálculo das médias de cada nível de dano, resultando em valores entre 0 (nucleóides sem danos) e 400 (nucleóides 100% danificados), sendo este cálculo de grande valia para a avaliação de resultados do teste cometa e comumente usado em substituição às análises estatísticas convencionais.

### 3.10 Avaliação da hemólise em meio líquido

A avaliação da atividade hemolítica foi realizada coletando sangue de indivíduos voluntários e sadios em tubos falcon; o volume do tubo foi completado para 12 mL com PBS ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  2mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  3 mM; NaCl 154 mM; pH 7,4) e centrifugado por 5 minutos a 700 g (Fanem Baby®I Modelo 206 BL). Após essa etapa, o sobrenadante foi retirado e o procedimento repetido por 3 vezes. Os eritrócitos foram diluídos até a concentração de 2 e 0,15%. Paralelamente, foram preparadas soluções de óleo essencial nas concentrações de 0,6; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 10,0  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , os controles foram compostos por eritrócitos em PBS (controle de hemólise mecânica) e eritrócitos em água destilada (controle de hemólise total).

Os eritrócitos, juntamente com as amostras dos óleos essenciais e os controles foram adicionados a microtubos e incubados a 37 °C por 1h (neste período os microtubos foram homogeneizados de 10 em 10 minutos). Decorrido o período da incubação, foi realizada centrifugação por 5 minutos a 1500 g e realizadas leituras em espectrofotômetro a 412 nm conforme metodologia descrita por Rangel et al. (1997) com pequenas modificações.

O efeito hemolítico (% de hemólise) foi acompanhado medindo-se a concentração de hemoglobina no sobrenadante, de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{A_{\text{am}} - A_{\text{PBS}}}{A_{\text{H}_2\text{O}} - A_{\text{PBS}}} \times 100$$

em que  $A_{\text{am}}$ ,  $A_{\text{PBS}}$  e  $A_{\text{H}_2\text{O}}$  são respectivamente as absorbâncias da amostra, dos controles em PBS e do controle em água em 412 nm.

### 3.11 Avaliação da hemolise em meio sólido

Para análise da atividade hemolítica dos óleos essenciais, foram dissolvidos 1,3 g de ágar em 100 mL de PBS, até a obtenção de uma solução transparente pelo aquecimento em micro-ondas. Essa solução foi resfriada até atingir a temperatura de 75 °C, acrescentando-se 1,0 mL de cloreto de cálcio. Quando a solução atingiu 60 °C, adicionou-se 0,1g de azida de sódio, reduzindo a temperatura para 50 °C. Adicionou-se então 1,2 mL de eritrócitos sanguíneos. O meio foi adicionado a placas de Petri. Foram feitos poços no meio entre 3 e 4 mm de diâmetro, as amostras de óleos essenciais nas concentrações de 5,5; 10,9; 21,8; 43,6 e 87,3  $\mu\text{L mL}^{-1}$  foram adicionadas nos poços, e as placas levadas à estufa a 37 °C. Paralelamente a esse procedimento, o óleo essencial de *M. viridis* nas concentrações de 5,5; 10,9; 21,8  $\mu\text{L mL}^{-1}$  foram incubadas com as peçonhas de *B. moojeni* e *L. muta* na concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$  em banho-maria a 37° C por uma hora; após esse período, os tratamentos foram adicionados a placas com meio de cultura para prever a inibição ou ativação do efeito hemolítico das peçonhas. A avaliação foi realizada pela medida do diâmetro do halo formado, após 12 h de incubação (PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982).

### 3.12 Avaliação da atividade fosfolipásica em meio sólido

Para análise da atividade fosfolipásica dos óleos essenciais, foi dissolvido 1,3 g de ágar em 100 mL de PBS (fosfato tamponado em salina) até a obtenção de uma solução transparente pelo aquecimento em micro-ondas. Essa solução foi resfriada até atingir a temperatura de 75 °C, acrescentando-se 1,0 mL de cloreto de cálcio. Quando a solução atingiu 60 °C adicionou-se 0,1g de azida de sódio, reduzindo a temperatura para 50 °C. Adicionou-se então 1,8 mL de gema de ovo, sem o envoltório membranoso, produzindo o meio para a

atividade, rico em lecitinas, vertidos em placas de Petri. Após a solidificação do meio, foram feitos orifícios de 3 a 4 mm de diâmetro, as amostras de óleos essenciais nas concentrações de 5,5; 10,9; 21,8; 43,6 e 87,3  $\mu\text{L mL}^{-1}$  incubados com as peçonhas de *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. alternatus* (40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em banho-maria a 37° c por uma hora. Os tratamentos foram adicionadas aos poços, e as placas levadas à estufa a 37 °C. A avaliação foi realizada pela medida do diâmetro do halo formado, após 12h de incubação (PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982).

### 3.13 Análise estatística

Os dados resultantes dos experimentos de atividade antibacteriana e genotóxico foram submetidos à análise de variância pelo programa estatístico Sistema de Análise de Variância para dados Balanceados (SISVAR), segundo Ferreira (2011) e ao teste de média comparado pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. As variáveis quantitativas (atividades antioxidantes) foram submetidas à análise de regressão em cada metodologia testada. Para as atividades hemolíticas e fosfolipásica, foi avaliado o erro (diferença entre o valor da medida e o valor verdadeiro) através de barras de erros, que expressam graficamente quantidades de erros potenciais relativos a cada ponto de dados em uma série de dados.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Óleos essenciais, rendimento e caracterização química

Os resultados obtidos para o teor de umidade e rendimento das extrações dos óleos essenciais das duas espécies de *Mentha* estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 Teor de umidade e rendimento dos óleos essenciais de *Mentha*.

Espécie vegetal	Teor de umidade (%)	Rendimento dos óleos p/p(%)
<i>M. pulegium</i>	76	2,54
<i>M. viridis</i>	84	1,52

Observa-se pelos dados descritos na Tabela 1 que as espécies de *Mentha* apresentam um alto teor de umidade, destacando-se o maior valor para a *M. viridis*.

Mkaddem et al. (2009), estudando o óleo essencial de *M. viridis*, encontraram um rendimento de 0,8% em base úmida, o que explica o valor inferior ao encontrado neste estudo, que foi realizado em base livre de umidade.

Boukhebti et al. (2011), estudando o óleo essencial de *M. pulegium*, encontraram um rendimento de 1% para o óleo essencial, rendimento também inferior ao encontrado neste trabalho; contudo neste caso, os dois estudos foram realizados em base seca. Nesse mesmo ano, Shahmohamadi et al. (2011), também estudando o óleo essencial de *M. pulegium*, encontraram um rendimento de 3,5% muito superior ao de Boukhebti et al. (2011) e também ao do encontrado neste trabalho.

Ait-Ouazzou et al. (2012) estudando a composição química e o rendimento do óleo essencial de *M. pulegium*, obteve para essa planta 2,7% de óleo essencial em base livre de umidade, valor que corrobora com os dos estudos realizados.

Variações no rendimento e também na umidade do material vegetal são explicadas pela variação de localização, época de coleta, estresse em que a planta foi exposta, entre outros fatores; portanto, diferenças de rendimento e umidade são muito comuns quando são realizados trabalhos com óleos essenciais (GOBBO-NETO, 2007).

Na constituição química do óleo essencial de *M. pulegium*, foram identificados 7 componentes (Tabela 2). Observa-se que os constituintes majoritários foram a pulegona (50,01%), mentol (31,9%) e mentona (16,56%), como ilustrado na Figura 9.

Tabela 2 Composição química do óleo essencial de *Mentha pulegium* L.

N ° Pico	TR	Composto	% Área
1	5,75	$\alpha$ - felandreno	0,2
2	6,96	$\beta$ -pineno	0,17
3	8,64	Cicloexeno	0,41
4	13,84	Mentona	16,56
5	14,40	cis- isopulegona	0,75
6	14,63	Mentol	31,9
7	17,03	Pulegona	50,01

\*TR-Tempo de retenção

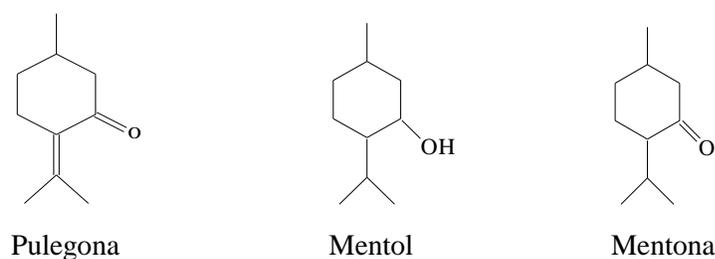


Figura 9 Constituintes majoritários presentes no óleo essencial de *Mentha pulegium* L.

Oliveira et al. (2011), estudando o óleo essencial de *Mentha pulegium* obtidos na primavera e no inverno, detectaram 6,62% de borneol e 61,43% de pulegona na primavera, e 8,87% de borneol e 28,40% de pulegona no inverno. Nesse trabalho, os autores mostraram a influência de sazonalidade com uma redução de 54% de pulegona no inverno. Provavelmente isso ocorreu porque nos óleos essenciais de *M. pulegium* a pulegona é precursora para a formação de estereoisômeros da mentona, os quais originam derivados acetilados de mentila, de neoisomentila e isomentila, reduzindo o teor de pulegona nos óleos essenciais.

Pode-se observar que o constituinte majoritário pulegona apresenta valor próximo ao encontrado neste estudo, quando comparado ao resultado obtido na primavera, diferindo-se entretanto para o constituinte borneol.

Ait-Ouazzou et al. (2012) estudando a composição química do óleo essencial de *M. pulegium*, obtiveram como constituintes majoritários pulegona (69,8%), seguido de piperitenona (3,1%), isopulegona (1,8%), e cis-epóxido de piperitona (1,7%). Para os autores, o composto pulegona foi observado em todos os estudos referentes a óleos essenciais de *M. Pulegium*; os demais constituintes variaram em função de fatores climáticos e genéticos.

Na Tabela 3 apresentam-se os 33 constituintes encontrados no óleo essencial de *M. viridis*, sendo os constituintes majoritários o linalol (40,7%), carvona (13,52%) e  $\alpha$ -terpineno (8,56%), ilustrados na Figura 10.

Tabela 3 Composição química do óleo essencial de *Mentha viridis* (L). L.

Nº Pico	TR	Composto	%Área
1	5,544	$\alpha$ -tujeno	0,2
2	5,74	$\alpha$ -pineno	0,69
3	6,818	Sabineno	1,04
4	6,936	$\beta$ -pineno	1,01
5	7,164	3-octanona	3,07
6	7,284	Mirceno	2,21
7	7,429	$\alpha$ -Terpineno	8,56
8	8,155	Etilexanol	0,28
9	8,425	p-cimeno	2,81
10	8,563	Limoneno	3,53
11	8,667	1,8-cineol	2,78
12	8,848	$\beta$ -ocimeno	0,38
13	9,229	$\beta$ -ocimeno	0,18
14	9,633	$\gamma$ -terpineno	0,93
15	9,955	trans-sabineno	5,24
16	10,164	trans-Linalol	0,03
17	10,757	Terpinoleno	0,47
18	11,266	Linalol	40,7
19	12,086	Ment-2-en-1ol	0,54
20	14,359	terpinen-4-ol	5,82
21	14,933	$\alpha$ -terpineol	0,84
22	15,105	Cicloexanol	0,21
23	16,192	trans carveol	0,09
24	16,414	Isoascaridol	0,07
25	16,793	Isovalerato	1,07
26	17,209	Carvona	13,52
27	24,119	$\beta$ -Farneseno	0,01
28	24,517	Biciclo[7.2.0]undec-4-ene,	2,01
29	26,289	$\alpha$ -humuleno	0,09
30	27,024	$\gamma$ -cadineno	0,32
31	27,434	Germancreno D	0,07
32	28,704	Ác. Propanoico	0,05
33	31,051	Oxido de cariofileno	0,25

\*TR-Tempo de retenção

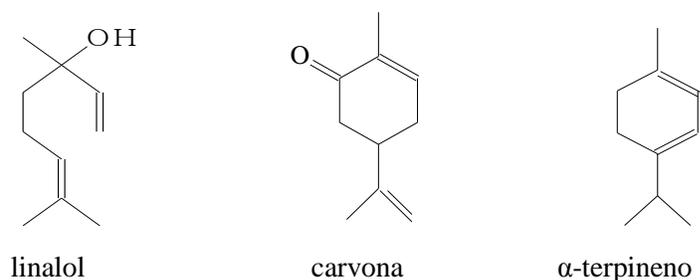


Figura 10 Constituintes majoritários presentes no óleo essencial de *Mentha viridis* (L). L.

Mkaddem et al. (2009), estudando o óleo essencial de *M. viridis*, encontraram como constituintes majoritários carvona (50,47%), seguido por 1,8-cineol (9,14%), limoneno (4,87%), cânfora (3,68%) e β-cariofileno (3%). Todos os constituintes majoritários encontrados pelos autores, exceto a cânfora, também foram encontrados neste estudo; contudo, apenas a carvona foi encontrada como constituinte majoritário nos dois estudos.

Ashnagar et al. (2007), estudando o óleo essencial de *M. viridis*, encontraram a carvona como constituinte majoritário, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho, que apresentaram como constituintes majoritários o linalol, a carvona e o α-terpineno.

A composição química dos óleos essenciais é influenciada por diversos fatores que acarretam algumas variações na constituição desses compostos, o desenvolvimento foliar e/ou surgimento de novos órgãos, pode levar à menor concentração desses metabólitos por translocação. Outros fatores, como a sazonalidade, os índices pluviométricos, o estresse a que a planta é exposta também influenciam a quantidade e a qualidade dos constituintes dos óleos essenciais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

#### **4.2 Análise da atividade antibacteriana dos óleos essenciais**

Os efeitos de atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *M. pulegium* e *M. viridis* sobre as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Salmonella Choleraesuis* e sobre as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 Efeito dos óleos essenciais de *M. pulegium* e *M. viridis* sobre o crescimento de bactérias.

Médias dos diâmetros dos halos de inibição(mm)									
		Concentração( $\mu\text{L mL}^{-1}$ )							
Bactérias	Amostras	500	250	125	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9
<i>E. Coli</i>	<i>M. pulegium</i>	11,0aa	10,0aa	7,0bb	<b>6,0ac</b>	NIad	NIad	NIad	NIad
	<i>M. viridis</i>	8,0ba	8,5ba	8,5aa	<b>6,0ab</b>	NIac	NIac	NIac	NIac
<i>S. Choleraesuis</i>	<i>M. pulegium</i>	14,0aa	11,0bb	10,0bc	10,0ac	<b>8,0ad</b>	NIae	NIae	NIae
	<i>M. viridis</i>	13,0ba	13,0ab	12,0ab	11,5ac	<b>8,0ac</b>	NIad	NIad	NIad
<i>S. aureus</i>	<i>M. pulegium</i>	9,5ba	8,5ab	5,5bc	5,5bc	5,0ac	<b>5,0ac</b>	NIad	NIad
	<i>M. viridis</i>	11,0aa	8,0ab	8,0ab	<b>8,0ab</b>	NIbc	NIbc	NIac	NIac
<i>L. monocytogenes</i>	<i>M. pulegium</i>	10,5aa	9,5ab	6,5bc	<b>6,0ad</b>	NIae	NIae	NIae	NIae
	<i>M. viridis</i>	9,5ba	9,5aa	<b>7,0ab</b>	NIbc	NIac	NIac	NIac	NIaca

NI: Não inibiu. A primeira letra representa a análise estatística dos óleos essenciais (*M. pulegium* e *M. viridis*) dentro de apenas uma concentração. A segunda letra representa a análise estatística de apenas um óleo essencial em todas as concentrações testadas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a nível de 5% de probabilidade.

Pelos resultados demonstrados na tabela, infere-se que os óleos essenciais de *M. pulegium* e *M. viridis* apresentaram a mesma concentração mínima inibitória (CMI) de  $62,5 \mu\text{L mL}^{-1}$  para a bactéria Gram-negativa *Escheria coli*, formando halos de inibição de 6 mm nessa concentração. Ao contrário da *E. coli*, a bactéria Gram-negativa *Salmonella Choleraesuis* foi mais sensível aos óleos essenciais, sendo encontrada a concentração mínima inibitória de  $31,3 \mu\text{L mL}^{-1}$  para ambos os óleos essenciais, havendo formação de halos de inibição de 8 mm.

Para as bactérias Gram-positivas, houve diferenças nas concentrações mínimas inibitórias dos óleos essenciais. Para a bactéria *Staphylococcus aureus*, o óleo essencial de *M. pulegium* foi mais eficaz, sendo a concentração mínima inibitória de  $15,6 \mu\text{L mL}^{-1}$  e o halo de inibição formado de 5 mm, ao passo que, para o óleo essencial de *M. viridis*, a concentração mínima inibitória foi de  $62,50 \mu\text{L mL}^{-1}$  e halo de inibição de 8 mm.

Os óleos essenciais inibiram a bactéria Gram-positiva *Listeria monocytogenes* nas concentrações mínima inibitória e halos de inibição nos valores de  $62,50 \mu\text{L mL}^{-1}$ ; 6 mm e  $125 \mu\text{L mL}^{-1}$ ; 7 mm para os óleos de *M. pulegium* e *M. viridis*, respectivamente.

O óleo essencial de *M. pulegium* apresentou maior atividade inibitória para *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, com concentrações mínima inibitória de  $15,6 \mu\text{L mL}^{-1}$  e  $62,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ , respectivamente. Já para os micro-organismos *S. Choleraesuis* e *E. coli*, o óleo essencial de *M. pulegium* apresentou resultados semelhantes ao do óleo essencial de *M. viridis*, ou seja  $31,3 \mu\text{L mL}^{-1}$  e  $62,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ , respectivamente. Provavelmente isto ocorreu devido tanto à diferença entre as bactérias, como à diferença dos constituintes químicos presentes no óleo essencial. O antibiótico Cloranfenicol inibiu todas as bactérias, formando halo de inibição de 25 mm para todos os micro-organismos testados na concentração de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Boukhebti et al. (2011), estudando o óleo essencial de *M. pulegium*, observaram que, para os micro-organismos *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, o óleo essencial só apresentou efeitos nas diluições 1:1 e 1:2, formando halos de inibição de 10 e 7 mm para *Escherichia coli* e 12,5 e 7 mm para *Staphylococcus aureus*, resultados diferentes daqueles encontrados neste estudo, em que o óleo essencial de *M. pulegium* apresentou atividade nas diluições 1:4 para *Escherichia coli* e 1:6 para *Staphylococcus aureus*. Essa diferença pode estar associada a variação e quantidade dos constituintes presentes no óleo essencial, visto que Boukhebti et al. (2011) encontraram pulegona (38,8%), mentona (19,2%) e  $\beta$ -bourboneno (16,4%) e, no presente trabalho foram encontradas pulegona (50,01%), mentona (31,90%) e mentol (16,56%) como constituintes majoritários.

Shahmohamad et al. (2011), também estudando o óleo essencial de *M. pulegium*, não observaram efeito de inibição para *Escherichia coli* nas concentrações testadas de 1,50; 3,00; 6,25; 12,50; 25; 50 e 100  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , resultados diferentes dos encontrados neste e em outros estudos citados anteriormente.

Mkaddem et al. (2009), estudando o efeito do óleo essencial de *M. viridis* sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, observaram que esse óleo essencial apresentou efeito inibidor perante apenas a *Listeria monocytogenes*, diferindo, assim dos resultados encontrados neste trabalho, tendo que o óleo essencial dessa espécie, neste estudo, apresentou atividade em todos os micro-organismos testados. Esse efeito pode ser relacionado com os constituintes presentes no óleo essencial. No trabalho do autor, foi encontrado como constituinte majoritário a carvona (50%), diferindo dos resultados encontrados neste trabalho, em que foi evidenciada a presença do linalol (40,7%), carvona (13,52%) e  $\alpha$ -terpineno (8,56%), perfazendo um total de (62,78%).

A lipofilicidade dos óleos essenciais conferem a esses propriedades de rompimentos de camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídeos interferindo na permeabilidade das membranas e acarretando a perda de íons, colapso da força próton motiva, além de depressão do pool de ATP. Esses efeitos, associados à coagulação do citoplasma, impedem o transporte de solutos, a regulação do metabolismo, as sínteses de DNA, RNA e proteínas. Estes efeitos são descritos como prováveis mecanismos de ação dos óleos essenciais (BURT, 2004; DI PASQUA et al., 2006).

#### **4.3 Atividades antioxidantes dos óleos essenciais**

A determinação da atividade antioxidante pelo método da 2-desoxirribose, visualizada na Figura 11, mostra que o óleo essencial de *M. pulegium* apresentou maior atividade antioxidante, seguido do óleo essencial de *M. viridis*, e com menor atividade antioxidante, tem-se o açúcar manitol. O  $IR_{50}$  da atividade foram de 196,37; 340,36; 5115,34  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

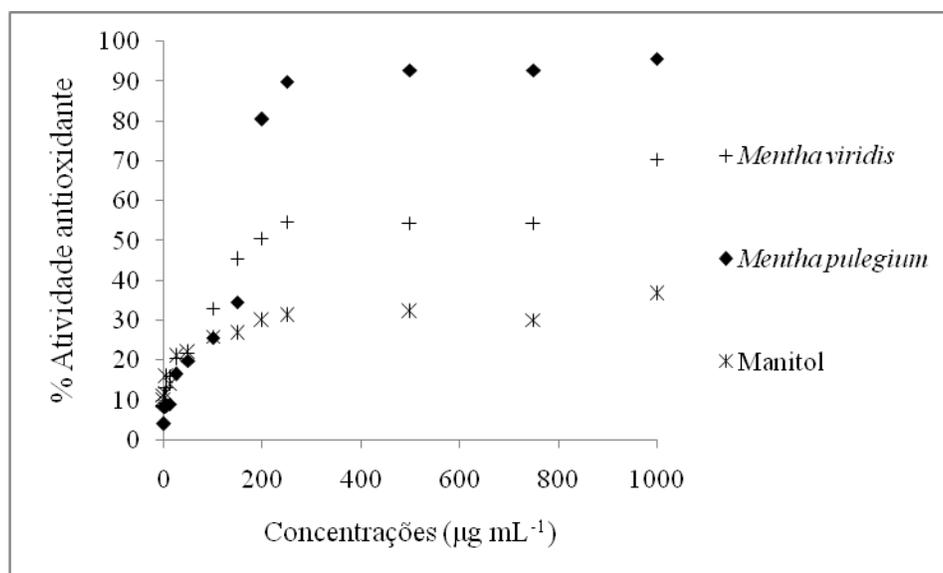


Figura 11 Gráfico da atividade antioxidante pelo método 2-desoxirribose

Singh et al. (2009) avaliaram a atividade antioxidante pelo método 2-desoxirribose dos óleos essenciais de folhas frescas e folhas em decomposição de uma espécie de eucalipto, que apresentaram como constituintes majoritários  $\alpha$ -pineno (28,53%), 1,8-cineol (19,48%) e  $\beta$ -citronelal (14,15%), isopulegol (13,35%), e  $\beta$ -citronelol (10,73%), respectivamente. Os autores observaram que o radical hidroxil foi inibido em 56,4% para folhas frescas e 62,7% para folhas em decomposição, na concentração de 400  $\mu\text{L mL}^{-1}$ . No presente estudo, para a concentração de 500  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , o óleo essencial de *M. viridis* apresentou atividade de 54,3% e o óleo essencial de *M. pulegium*, 92,9%.

Mimica-Dukic et al. (2003), estudando os óleos essenciais puro e em solução de *M. piperita*, *M. longifolia* e *M. aquatica* em 20 e 50% de hexano, observaram que o óleo essencial de *M. aquatica* com os constituintes majoritários 1,8-cineol (14,15%), mentofurano (16,94%) e E-cariofileno (9,36%) foi o que apresentou menor atividade entre as amostras estudadas, com valor de

8,6% (em solução de 20% de hexano), valor muito inferior aos encontrados neste estudo para *M. viridis* e *M. pulegium*. O óleo essencial de *M. longifolia* apresentou atividade antioxidante (18,2%), quando foi testado puro. Ao analisar os constituintes desse óleo, os autores encontraram como majoritários a piperitona (38,79%), mentona (11,20%) e pulegona (4,88%), compostos também presentes no óleo essencial de *M. pulegium*. O estudo com óleo essencial de *M. piperita* foi o que apresentou maior atividade (24%) por este método. Entre os constituintes presentes, encontra-se o mentol (39,63%), metilacetato (10,44%) e mentona (8,93%). Comparando esses resultados com aqueles encontrados neste trabalho, observa-se que os óleos essenciais de *M. pulegium* e *M. viridis* apresentaram maior atividade antioxidante, provavelmente devido à presença dos diferentes constituintes presentes no óleo essencial.

O ensaio da atividade antioxidante pelo método do poder redutor é comumente empregado para estudar a capacidade antioxidante de materiais vegetais. A determinação da atividade antioxidante pelo poder redutor do ferro, (Figura 12), mostra que a atividade antioxidante de redução do íon ferro é maior com o aumento da concentração das amostras. Esse fato é evidenciado pelo antioxidante BHT, pois, a partir da primeira concentração, o valor da atividade antioxidante para esse padrão é baixa e aumenta significativamente com o aumento da concentração.

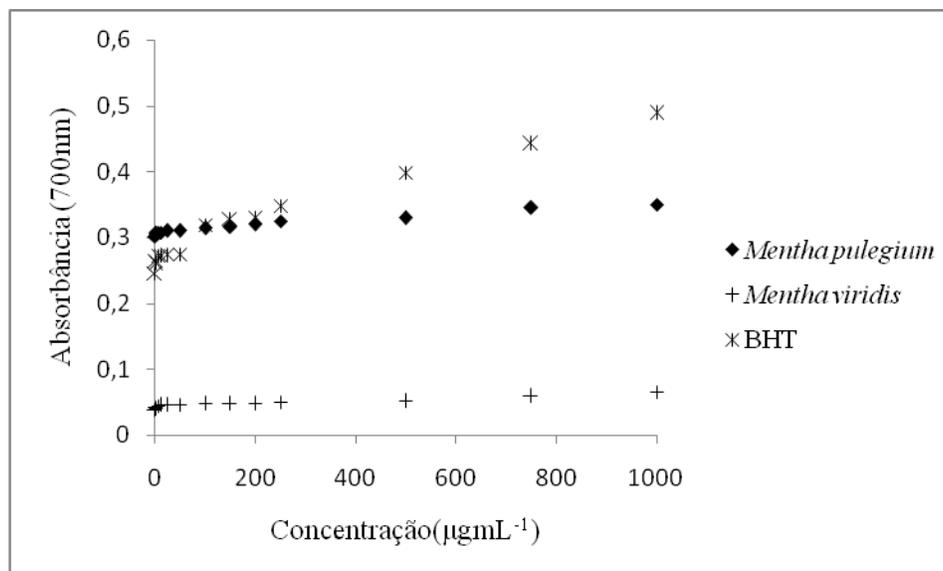


Figura 12 Gráfico da atividade antioxidante pelo método do poder redutor

Salarbashi et al. (2014), estudando o efeito de películas de empacotamento produzidas a partir de feijão de soja solúvel incorporadas com óleos essenciais de *Zataria multiflora* Boiss e *M. pulegium*, observaram que a redução do íon ferro foi dependente da concentração dos óleos essenciais estudados. Os autores sugeriram que o poder redutor desses filmes são maiores para os filmes contendo *Zataria multiflora* Boiss do que aqueles contendo *M. pulegium* em todas as concentrações analisadas. Essa diferença de atividade foi atribuída aos fenilpropanoides e terpenos presentes no óleo essencial de *Zataria multiflora* Boiss (timol, carvacrol e  $\gamma$ -terpineno) diferentemente daqueles encontrados no óleo essencial de *M. pulegium* (pulegona, mentona e piperitona). No presente estudo, pode-se observar que o óleo essencial de *M. viridis* apresentou atividade antioxidante muito limitada em reduzir o íon ferro. Por outro lado o óleo essencial de *M. pulegium*, nas concentrações de 0,78 a 50 µL

$\text{mL}^{-1}$ , superaram a atividade antioxidante do padrão BHT; contudo a partir da concentração de  $100 \mu\text{L mL}^{-1}$ , o padrão apresentou atividade antioxidante maior.

A atividade antioxidante pelo método do fosfomolibdato mostrou que o BHT (padrão muito utilizado na indústria) foi o mais eficiente partir da concentração de  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Em concentrações inferiores, o óleo essencial de *M. pulegium* apresentou atividade antioxidante melhor que o padrão, seguida do óleo essencial de *M. viridis*, como mostrado na Figura 13.

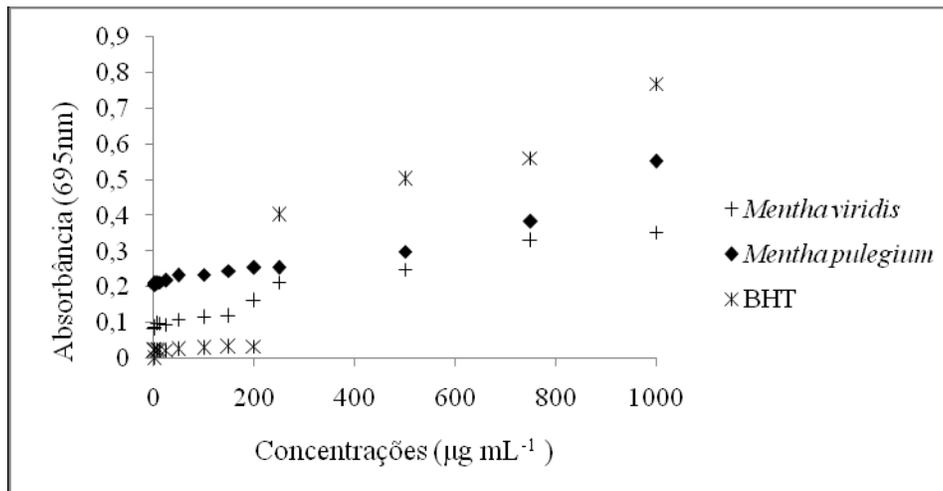


Figura 13 Gráfico da atividade antioxidante pelo método de redução do fosfomolibdato

Avaliando a eficácia antioxidante dos óleos essenciais de *M. viridis*, *M. pulegium* e do padrão BHT pelo método de redução do molibdênio equivalente ao ácido ascórbico, têm-se 269,15; 298,48 e 663,96  $\mu\text{g g}^{-1}$  (grama de óleo essencial ou padrão por micrograma de ácido ascórbico), respectivamente. Nota-se que quando comparado ao padrão BHT, o potencial antioxidante equivalente ao ácido ascórbico dos óleos essenciais analisados é, em média, 1/3 do potencial

do padrão testado na concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Em concentrações baixas, os óleos apresentaram maior potencial antioxidante que o padrão utilizado.

Franco (2013), avaliando a bioprospecção das partes aéreas e óleo essencial de *Liquidambar styraciflua* L., observou que tanto para os padrões-referência, quanto para a amostra, a capacidade antioxidante total é dose-dependente, pois conforme a concentração foi aumentada, os valores de capacidade antioxidante também foram. O maior valor de capacidade antioxidante total encontrado para as amostras das cascas e caule de *L. styraciflua* pode estar relacionado com a presença de compostos que agem por ambos os mecanismos de redução, radicalar e redox, provocando uma maior redução do complexo. Os óleos essenciais neste estudo também foram dose-dependente, pois o aumento da concentração dos óleos essenciais acarretou um aumento da atividade.

Antônio (2011), estudando a caracterização fitoquímica, morfo-anatomia e atividades biológicas de extratos e óleo de *Eucalyptus badjensis* BEUZEV. & WELCH, demonstram em seus resultados que nenhuma amostra testada apresentou capacidade maior que a do ácido ascórbico em reduzir o complexo fosfomolibdênio.

As possibilidades de avaliação de atividade antioxidante *in vitro* de um composto biologicamente ativo são diversas, pois não existe um método universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisamente e quantitativamente como visualizado nesses estudos, pois atividades diferentes proporcionaram diferentes valores em porcentagem de remoção de radicais distintos. Inúmeras espécies reativas devido às suas diferentes formas de atuação em organismos vivos são utilizadas para avaliar atividades antioxidantes; portanto, quanto mais métodos utilizados melhor, uma vez que cada técnica apresenta um princípio que depende da matriz de reação; além disso, os compostos bioativos podem reagir de forma diferente, dependendo do radical ou

agente oxidante utilizado no método, como visualizado para os óleos essenciais em estudo (ALVES et al., 2010).

#### 4.4 Atividades fosfolipásica e hemolíticas

As Figuras 14 e 15 apresentam os resultados de atividade de inibição de fosfolipases de peçonhas pelo óleo essencial de *M. pulegium* e *M. viridis*, respectivamente.

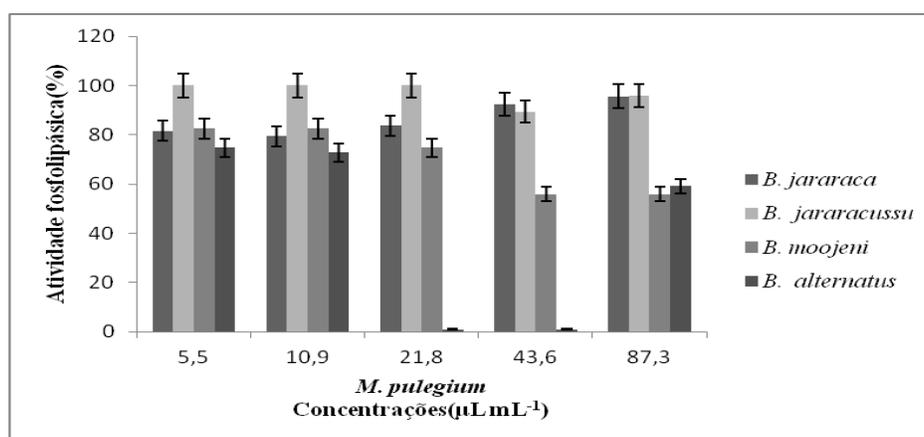


Figura 14 Efeito do óleo essencial de *M. pulegium* sobre a atividade fosfolipásica induzida por peçonhas de serpentes

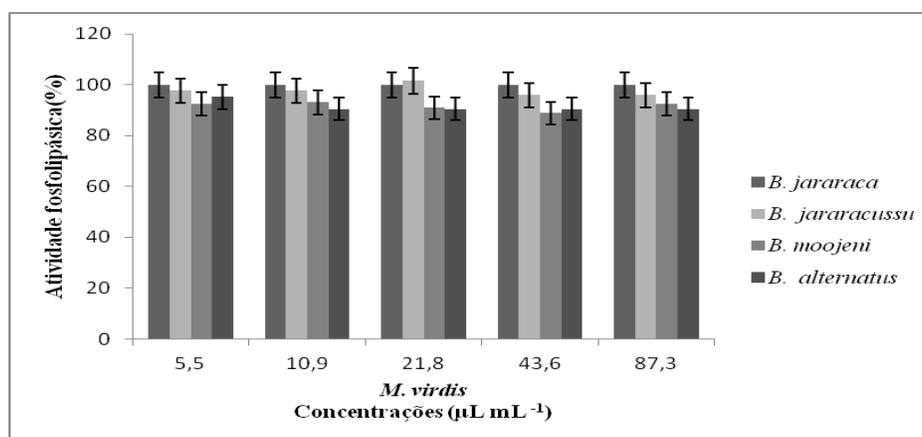


Figura 15 Efeito do óleo essencial de *M. viridis* sobre a atividade fosfolipásica induzida por peçonhas de serpentes

Nas Figuras 14 e 15 observa-se que para a peçonha de *Bothrops jararaca* o óleo essencial de *M. viridis* não apresentou efeito inibidor, ao passo que o óleo essencial de *M. pulegium* apresentou efeito considerável de (20,6%), o que pode ser explicado pela diferença de constituição dos óleos essenciais. Os estudos realizados com a peçonha de *Bothrops jararacussu* mostraram que os dois óleos essenciais apresentaram um pequeno efeito de inibição, da ordem de (4,1%), na atividade fosfolipásica a partir da concentração de 14,6 µL mL<sup>-1</sup>. A peçonha de *Bothrops moojeni* também foi inibida pelos óleos essenciais, tendo o efeito de inibição dessa peçonha se mostrado mais pronunciado para o óleo de *M. pulegium*. A avaliação do efeito inibidor para a peçonha de *Bothrops alternatus* revelou um pequeno efeito de inibição (9,5%) para todos os volumes de óleo essencial de *M. viridis*, já para o óleo de *M. pulegium*, as concentrações de 21,8 e 43,6 µL mL<sup>-1</sup> foram capazes de inibir 100% a atividade fosfolipásica.

Terra e Lema (2007), comparando a toxicidade entre peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* presentes nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil, observaram que a variação dos efeitos das peçonhas de *B. alternatus* e *B.*

*jararaca* ocorrem tanto dentro do gênero quanto em relação ao ambiente em que estas espécies se encontram. Os estudos revelaram que nas amostras de peçonhas regionais de *B. jararaca* o efeito fosfolipásico foi mais pronunciado do que nas amostras da peçonha nacional; contudo, esse efeito não apresentou diferença significativa em testes estatísticos. Os testes com *B. alternatus* mostraram superioridade da peçonha regional em relação à peçonha nacional. Dessa forma, embora se tenha padronizado as concentrações de peçonhas a serem utilizadas como ferramentas indutoras da atividade fosfolipásica, os diferentes níveis de inibição observados se devem não apenas à composição variada dos óleos, mas também às diferentes estruturas e quantidades de fosfolipases presentes na peçonha de cada espécie de serpente utilizada.

Para o ensaio de hemólise em meio sólido, pode-se observar que o óleo essencial de *M. pulegium* apresentou um efeito crescente de atividade hemolítica, sendo esse efeito iniciado com  $5,5 \mu\text{L mL}^{-1}$  e mostrando-se mais pronunciado para a concentração de  $87,3 \mu\text{L mL}^{-1}$ , enquanto que o óleo de *M. viridis* apresentou baixa atividade, sendo esta visualizada apenas nas concentrações de  $43,6$  e  $87,3 \mu\text{L mL}^{-1}$ , como evidenciado na Figura 16.

Apenas o óleo de *M. viridis* apresentou efeito inibidor sobre a hemólise induzida por peçonhas em meio sólido, observa-se 7,7% de inibição da atividade de *Lachesis muta*, para a concentração de  $5,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ , e uma porcentagem de inibição de 6,7% para a atividade de *B. moojeni* nas concentrações de 5,5; 10,9 e  $21,8 \mu\text{L mL}^{-1}$  (Figura 17).

Durante os ensaios de inibição da peçonha de *L. muta* a concentração de  $21,8 \mu\text{L mL}^{-1}$  do óleo de *M. viridis* resultou em atividade superior à observada no controle contendo apenas peçonhas. A potencialização do efeito pode ter resultado de sinergismo entre os constituintes do óleo e da peçonha (Figura 17).

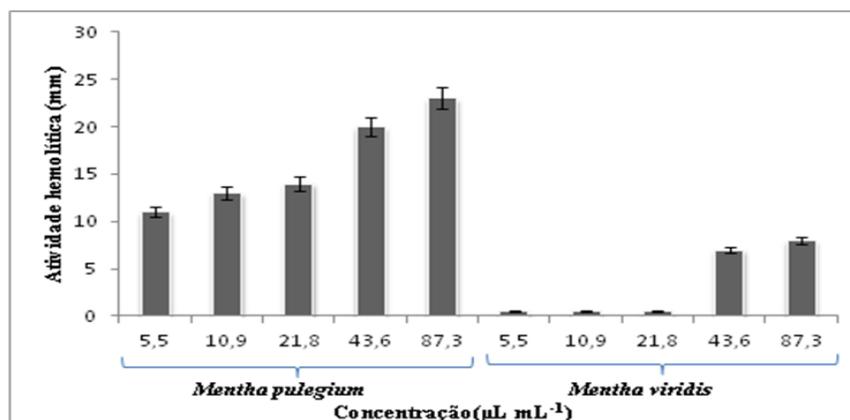


Figura 16 Atividade hemolítica de óleos essenciais em meio sólido

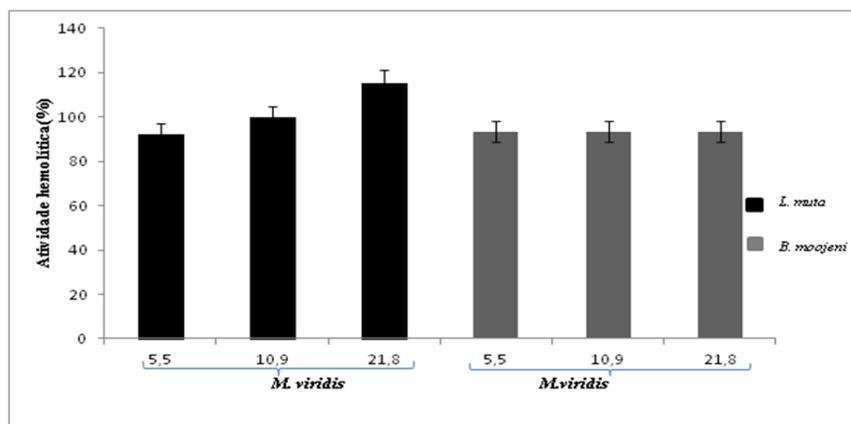


Figura 17 Efeito do óleo essencial de *M. viridis*, sobre a atividade hemolítica induzida pelas peçonhas de *L. muta* e *B. moojeni*

O estudo realizado por meio da hemólise em meio líquido apresentou resultados distintos dos encontrados para hemólise em meio sólido. A avaliação dos hematócritos na concentração de 0,15% resultou em hemólise próxima a 100% para todos os volumes dos dois óleos essenciais testados, como mostrado na Figura 18.

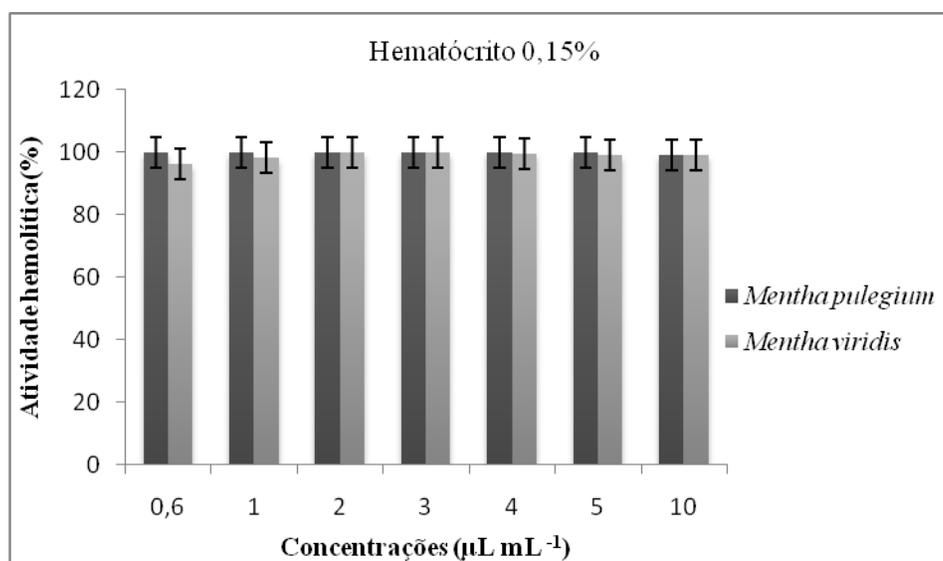


Figura 18 Hemólise em meio líquido dos óleos essenciais de *M. viridis* e *M. pulegium*

O valor de 100% de hemólise corresponde a incubações feitas com adição de água, ao passo que 0% de hemólise correspondeu aos valores de hemólise mecânica resultante das manipulações implícitas ao teste.

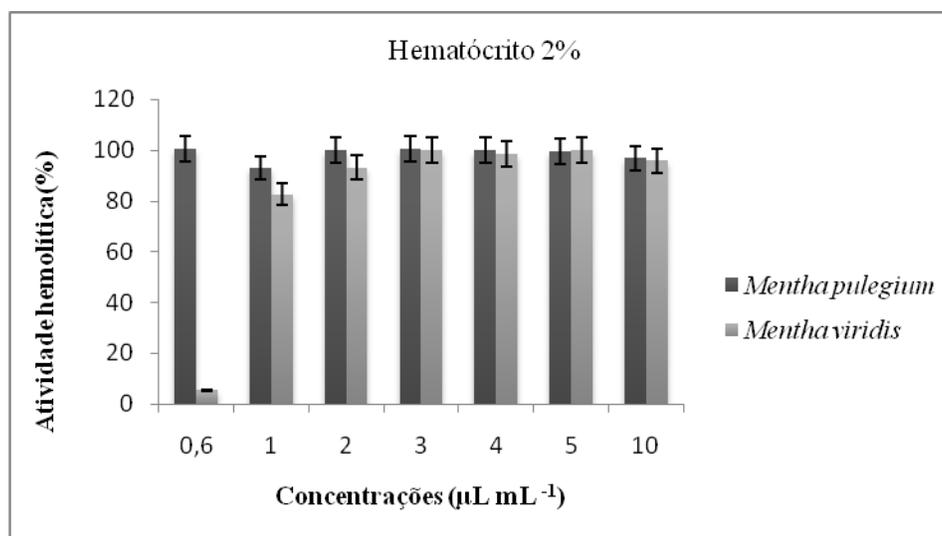


Figura 19 Hemólise em meio líquido dos óleos essenciais de *M. viridis* e *M. pulegium*

O aumento da concentração de hematócritos gerou variação do resultado hemolítico em meio líquido. Observa-se hemólise de aproximadamente 6% para o óleo essencial de *M. viridis* na concentração de 0,6 µL mL<sup>-1</sup>; na concentração de 1 µL mL<sup>-1</sup> ocorre um aumento significativo de hemólise para o óleo essencial de *M. viridis* (83%). Com o aumento da concentração, a atividade hemolítica aumenta para 100%. No óleo essencial de *M. pulegium*, não foi observada esta diferença em relação ao aumento da concentração de hematócrito, acarretando em hemólise de 100% em todas as concentrações testadas.

O meio e também a concentração de hematócritos são fatores essenciais para avaliação da atividade hemolítica, sendo esses fatores responsáveis por variações consideráveis de atividade. O organismo humano, que apresenta cerca de 45% de hematócitos, provavelmente terá efeitos dos óleos essenciais

diferentes àqueles apresentados no trabalho, pois a concentração do hematócrito é muito superior à utilizada no teste.

Marya et al. (2012), avaliando as atividades hemolíticas do óleo essencial de cravo, e os constituintes majoritários eugenol e acetato de eugenil em eritrócitos humanos (10% hemácias), não observam na concentração de 0,01% efeito hemolítico para as amostras. Na maior concentração testada, de 0,2% v/v, foi observado que o acetato de eugenil, o eugenol e o óleo essencial de cravo induziram hemólise de 57, 40 e 48%, respectivamente. Neste estudo foi observado que o aumento da concentração do óleo essencial e dos constituintes majoritários acarretou em aumento da atividade hemolítica. Os ensaios realizados por Marya et al. (2012), avaliaram concentração de 10% de hemácias, o que pode ter acarretado as diferenças na porcentagem de hemólise deste trabalho em relação ao nosso estudo.

Quintans et al. (2013), determinando o efeito do óleo essencial de *Xylopiya laevigata* em eritrócitos de rato (2% ), observaram que as amostras de óleo essencial, em concentrações que variavam de 31,25 a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , não induziram hemólise. Os resultados encontrados por esses autores divergem dos encontrados neste trabalho, já que os óleos essenciais de *Mentha* apresentavam alta atividade hemolítica, mesmo quando avaliados em baixas concentrações.

Misharina et al. (2014), estudando os efeitos da ingestão de soluções contendo 150 ng de diferentes óleos essenciais por mililitro, observaram redução na porcentagem de hemólise com a ingestão de óleos. Sendo obtido o valor de 100% de hemólise para água e valores de 85% e 66,3% para os óleos essenciais de orégano e cravo, respectivamente. Neste estudo mostrou-se que os óleos essenciais em concentrações muito baixas podem proporcionar um efeito protetor dos

eritrócitos, considerando a presença de diversas células, moléculas e condições físico-químicas inerentes ao ambiente *in vivo* e ausentes no ambiente *em vitro*.

#### 4.5 Atividade genotóxica

Os óleos essenciais de *M. viridis* e *M. pulegium* induziram a fragmentação do DNA em todos os volumes avaliados, sendo os maiores níveis de fragmentação (classes 3 e 4) observados após tratamento dos leucócitos com o óleo de *M. viridis* as imagens referentes as classes de danos que podem ocorrer no teste do cometa são contempladas pela Figura 20. Os valores de unidades arbitrárias obtidos para *M. viridis* foram 86,2; 190 e 358,4, para as concentrações de 0,25, 0,5 e 1,0  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , respectivamente, sendo esses valores 3,9; 8,6 e 16,2 vezes maiores que o valor observado para o controle negativo (22,0), confirmando o potencial genotóxico do óleo. Para o óleo de *M. pulegium*, os mesmos volumes resultaram em valores de unidades arbitrárias (46,6; 55,2 e 349,6) 2,1; 2,5 e 15,8 vezes maiores que o obtido no controle negativo. Os óleos de *M. viridis* e *M. pulegium* apresentaram para a concentração de 1,0  $\mu\text{L mL}^{-1}$  valores de unidades arbitrárias (358,4 e 349,6, respectivamente) superiores ao observado para a droga antitumoral (159,0) utilizada como controle positivo, destacando ainda que ela foi avaliada em concentração 100 vezes superior à dos óleos (100  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ), como mostrado na Tabela 5.

Tabela 5 Efeito dos óleos essenciais sobre o DNA de leucócitos de sangue periférico humano.

Tratamentos ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ )	Nucleóides (%)					N.D.(%)	U.A.
	Classe dos cometas (% de danos)						
	0 (<5)	1(5-20)	2 (20-40)	3 (40-85)	4 (>85)		
C (-)	78,8 $\pm$ 3,4a	20,2 $\pm$ 3,0ab	1,0 $\pm$ 0,8a	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	21,2 $\pm$ 3,4a	22,0 $\pm$ 4,2a
C (+)	15,2 $\pm$ 3,2de	17,8 $\pm$ 3,1ab	36,2 $\pm$ 12,4c	14,8 $\pm$ 10,9c	16,0 $\pm$ 3,7b	84,8 $\pm$ 3,2de	159,0 $\pm$ 20,3c
<i>M. viridis</i> 0,25	49,8 $\pm$ 2,3c	24,4 $\pm$ 2,5a	18,4 $\pm$ 3,1b	4,6 $\pm$ 1,7ab	2,8 $\pm$ 2,2a	50,2 $\pm$ 2,3c	86,2 $\pm$ 7,4b
0,5	19,8 $\pm$ 6,6d	9,8 $\pm$ 1,9c	47,4 $\pm$ 6,5c	6,6 $\pm$ 3,9ab	16,4 $\pm$ 2,1b	80,2 $\pm$ 6,6d	190,0 $\pm$ 17,6c
1,0	5,8 $\pm$ 4,9ef	0,2 $\pm$ 0,3d	5,4 $\pm$ 5,3ab	7,0 $\pm$ 5,6ab	81,6 $\pm$ 6,9c	94,2 $\pm$ 4,9e	358,4 $\pm$ 8,7d
<i>M. pulegium</i> 0,25	69,8 $\pm$ 2,9ab	16,0 $\pm$ 4,4bc	12,6 $\pm$ 2,9ab	1,0 $\pm$ 0,8a	0,6 $\pm$ 0,9a	30,2 $\pm$ 2,9ab	46,6 $\pm$ 4,9ab
0,5	63,0 $\pm$ 6,8b	18,8 $\pm$ 1,4ab	16,6 $\pm$ 8,6b	1,6 $\pm$ 1,9a	0,0 $\pm$ 0,0a	36,0 $\pm$ 6,8b	55,2 $\pm$ 14,1ab
1,0	3,0 $\pm$ 3,6f	0,4 $\pm$ 0,6d	12,6 $\pm$ 9,1ab	12,0 $\pm$ 3,2bc	72,0 $\pm$ 10,0c	97,0 $\pm$ 3,6e	349,6 $\pm$ 17,9d

C (-): apenas a solução sanguínea. C (+): Doxorubicina ( $100\mu\text{g mL}^{-1}$ ), droga antitumoral genotóxica. N.D. (%): porcentagem de nucleóides com danos. U.A.: Unidades arbitrárias. Os valores representam as médias de 5 testes realizados com sangue de voluntários diferentes, sendo observados 300 nucleóides por tratamento/voluntário, contabilizando um total de 1.500 nucleóides/tratamento.

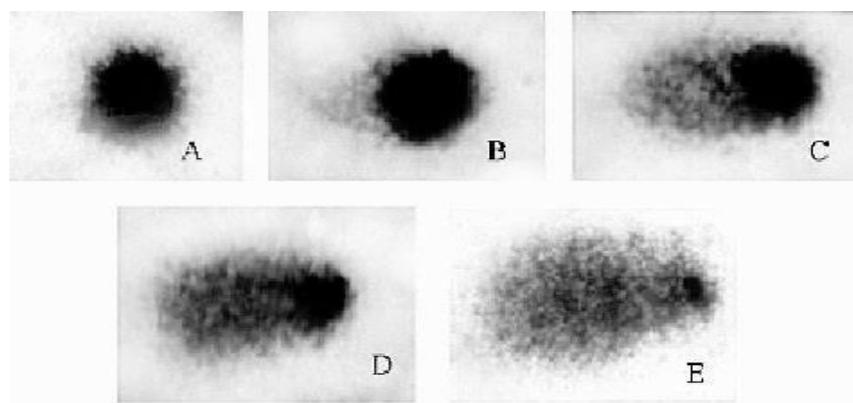


Figura 20 Fotos ilustrativas das classes de danos no DNA utilizadas para avaliação do ensaio cometa. A- Classe 0; B- Classe 1; C- Classe 2; D- Classe 3; E- Classe 4

Os óleos essenciais de *M. viridis* e *M. pulegium* na concentração de  $1\mu\text{L mL}^{-1}$  apresentaram também porcentagens de nucleoides com danos superiores à obtida para a doxorrubicina, sendo os valores 94,2; 97,0 e 84,8 correspondentes aos óleos e à droga controle, respectivamente.

Péres et al. (2009), avaliando o efeito do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* sobre o índice de danos do DNA em células V79, seguindo o método do cometa, verificaram um aumento significativo no índice de danos em concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e  $10,0\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ; os constituintes majoritários encontrados para o óleo essencial foram (E)-nerolidol (22,4%), (E)-cariofileno (8,9%),  $\alpha$ -humuleno (16,5%) e biciclogermacreno (7,4%). A incidência dos danos pelo ensaio do cometa mostra uma variação de classes de danos de 0 a 4 nas concentrações de 2,0; 4,0; 6,0 e  $10,0\ \mu\text{g mL}^{-1}$ . Em baixas concentrações (0,1-1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), observou-se uma alta incidência de classes 0 e 1. Em concentrações acima de  $2\ \mu\text{g mL}^{-1}$ , foram observadas as classes 2 e 3. Em qualquer concentração testada, não foi observado mais do que 10% de cometas

classe 4, destacando a importância dos resultados obtidos no presente estudo, com óleos essenciais de *Mentha*, em que a concentração de  $1\mu\text{L mL}^{-1}$  induziu a formação de cometas da classe 4 em mais de 70% dos nucleóides avaliados.

Andrade, Perazzo e Maistro (2008), estudando os efeitos genotóxicos de *Baccharis dracunculifolia* sobre células do sangue periférico de ratos, não observaram efeitos de fragmentação significativos sobre as moléculas de DNA.

Rassouli et al. (2011), investigando *in vitro* os efeitos citotóxico e apoptótico do monoterpênóide stilosin, extraído da espécie vegetal *Ferula ovina*, sobre células cancerosas, observaram que  $37\mu\text{g mL}^{-1}$  do stilosin induziu aproximadamente 65% de dano no DNA dessas células. Além disso, 89% das células apresentaram cromatina condensada, em comparação a um valor de 4% observado para as células não tratadas.

Apesar de grandes avanços na terapia do câncer, muitas células malignas, incluindo carcinomas de bexiga, mantêm sua resistência a quimioterapias atuais. Esse inconveniente leva a investigações em busca de novos compostos, principalmente de origem natural, visando a minimizar os efeitos adversos decorrentes dos tratamentos quimioterápicos tradicionais. Esse estudo apresenta resultados importantes para explicar os efeitos dos óleos essenciais testados (*M. viridis* e *M. pulegium*), uma vez que os terpenos representam os constituintes majoritários desses óleos, sendo esses compostos indutores de danos no DNA.

Os óleos essenciais geralmente apresentam toxicidade elevada com efeitos que podem levar à intoxicação aguda, assim como à intoxicação crônica. O uso tópico pode acarretar fototoxicidade, além de alergias; geralmente a toxicidade dos óleos essenciais é dose-dependente; contudo, em alguns casos, mesmo doses pequenas podem provocar danos severos (SIMÕES et al., 2007). Todas essas informações sobre os óleos essenciais vão ao encontro com os resultados obtidos neste trabalho, mostrando, portanto, que os óleos essenciais

apresentam uma enorme gama de atividades, sendo porém, necessária sua ampla caracterização, com vistas ao aproveitamento seguro de suas potencialidades farmacêuticas e/ou cosméticas.

## 5 CONCLUSÃO

O rendimento do óleo essencial de *M. pulegium* (2,54%) foi superior ao rendimento do óleo essencial de *M. viridis* (1,52%). Os constituintes majoritários do óleo essencial de *M. pulegium* foram pulegona, mentol e mentona, e de *M. viridis*, linalol, carvona e  $\alpha$ -terpineno.

Os dados de atividade antibacteriana demonstraram que os dois óleos apresentam efeitos inibitórios sobre o crescimento das bactérias testadas, sendo mais efetivos sobre as linhagens de *Salmonella Choleraesuis* e *Staphylococcus aureus*. A bactéria mais resistente aos óleos essenciais foi a *Escherichia coli*.

O óleo essencial de *M. pulegium* foi o que apresentou melhor atividade antioxidante pelo método 2-desoxirribose, seguido do óleo essencial de *M. viridis* e do manitol. Pelo método do poder redutor do ferro, somente o padrão BHT e o óleo essencial de *M. pulegium* apresentaram atividade antioxidante. Os dois óleos essenciais apresentaram atividade antioxidante pelo método do fosfomolibdênio, sendo essa correspondente à cerca de um terço da atividade observada para o BHT.

Os dados obtidos nos testes bactericida e antioxidante sugerem o alto potencial de aplicação dos óleos avaliados como conservantes naturais, podendo ter ampla aplicação em indústrias alimentícias, cosméticas, entre outras.

Os óleos essenciais de *M. pulegium* e *M. viridis* apresentaram efeito inibidor sobre a atividade de fosfolipases, sugerindo um possível potencial anti-inflamatório, assim como ação sobre mecanismos relativos à imunidade, uma vez que essas apresentam papel-chave na geração do ácido aracdônico e, conseqüentemente dos lipídios bioativos dele derivados (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos).

Embora o óleo de *M. viridis* tenha inibido parcialmente a atividade hemolítica induzida por peçonha, ambos os óleos foram capazes de hemolisar

eritrócitos humanos quando avaliados em meio sólido e líquido, ressaltando a necessidade de sua ampla caracterização, com vistas a definir doses efetivas e seguras para seu uso em insumos destinados ao consumo animal e humano.

Os óleos de *M. pulegium* e *M. viridis* apresentaram alto potencial genotóxico, embora não seja possível determinar a perpetuação desse efeito sobre as consecutivas gerações celulares, o que caracterizaria um efeito mutagênico e, conseqüentemente, carcinogênico, sendo necessária a realização de ensaios que complementem *in vitro* e *in vivo* visando a ampliar o conhecimento acerca de seus mecanismos de indução de danos. Considerando as restritas opções de tratamento quimioterápico disponíveis atualmente e suas origens fundamentalmente vegetais, pode-se sugerir que os óleos avaliados no presente trabalho mostram-se promissores na busca por formulações farmacêuticas alternativas.

Os dados obtidos no presente trabalho reafirmam a importância dos óleos essenciais como ricas fontes de moléculas biologicamente ativas, com inúmeras possibilidades de aplicação em diversas áreas do conhecimento, sendo, entretanto necessária ampla caracterização farmacológica e toxicológica, visando a determinar seus mecanismos de ação e, com isso, definir doses efetivas e seguras, possibilitando sua aplicação. Um possível uso dos óleos essenciais de *M.pulegium* e *M. viridis* seria na formulação de antissépticos em que os óleos essenciais seriam utilizados para proteger a pele contra micro-organismo como bactérias, já que esses óleos apresentaram grande atividade sobre estes micro-organismos e o antisseptico utilizado atualmente é o álcool 70% que causa ressecamento e perde o efeito rapidamente; portanto, a adição dos óleos ao álcool poderiam manter o efeito e reduzir o ressecamento da pele, ou ainda formulações de antissepticos a base desses óleos também seriam uma alternativa viável. Contudo, novos ensaios de toxicidade seriam necessários, pois os óleos não seriam ingeridos; portanto efeitos genotóxicos poderiam não ser

observados. Ensaio sobre a sensibilidade e irritação seriam necessários para que esses produtos apresentassem autorização de comercialização.

## REFERÊNCIAS

- ADSERSEN, A. et al. Screening of plants used in danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 104, n. 3, p. 418–422, Apr. 2006.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. 2. ed. Brasília, 2003. p. 10-16.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia brasileira**. 5. ed. Brasília, 2010. v. 1, p. 198–199. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/index.htm](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm)>. Acesso em: 12 dez. 2013.
- AIT-OUAZZOU, A. et al. Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. **International Food Research Journal**, Malaysia, v. 45, n. 1, p. 313–319, Jan. 2012.
- AKDOGAN, M. et al. Investigation of biochemical and histopathological effects of *Mentha piperita* L. and *Mentha spicata* L. on kidney tissue in rats. **Human & Experimental Toxicology**, London, v. 22, n. 4, p. 213-219, Apr. 2003.
- ALARCÓN, M. M. V. **Efeito inibitório dos óleos essenciais no crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em queijo ricota**. 2007. 66 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- AMSON, G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, nov./dez. 2006.
- ANDERSON, I. B. et al. Pennyroyal toxicity: measurements of toxic metabolite levels in two cases and review of the literature. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 124, n. 8, p. 726–734, Apr. 1996.

ANDRADE, M. A. et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet. **Antioxidants**, Basel, v. 2, n. 4, p. 384-397, Nov. 2013.

ANDRADE, N. S.; PERAZZO, F. F.; MAISTRO, E. L. Lack of clastogenic/genotoxic effects of *Baccharis dracunculifolia* extract on Swiss mouse peripheral blood cells. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 4, p. 1414-1421, Dec. 2008.

ANTÔNIO, R. D. **Caracterização fitoquímica, morfoanatômica e atividades biológicas de *Eucalyptus badjensis* Beuzev. & Welch, Myrtaceae**. 2011. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

ARANTES, A. V.; ANDRADE, M. C.; BARACHO, N. C. V. Estudo da atividade antimicrobiana das Folhas de *Jatropha curcas* L. frente ao *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Ciências em Saúde**, Manguinhos, v. 3, n. 2, p. 1-7, abr./jun. 2013.

ASHNAGAR, A. et al. Isolation and identification of the major chemical components found in Spearmint leaves (*Mentha viridis*) grown in Ahwaz city, Iran. **Biosciences, Biotechnology Research**, Bhopal, v. 4, n. 1, p. 43-48, 2007.

AUGUSTYNIAK, M. et al. DNA damage in grasshoppers' larvae – Comet assay in environmental approach. **Chemosphere**, Oxford, v. 96, p. 180–187, Feb. 2014.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. **Food Chemistry Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446–475, Feb. 2008.

BANDONI, A. L.; CZEPAK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores**. Vitória: EDUFES, 2008. 624 p.

BARBOSA, D. B. **Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae)**. 2008. 86 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

BARCELOUX, D. G. Pennyroyal and Pulegone (*Mentha pulegium L.*). **Medical Toxicology of Natural Substances**: foods, fungi, medicinal herbs, plants and venomous animals. Hoboken, p. 563–567, Jan. 2008.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, Basel, v. 17, n. 4, p. 3989-4006, Apr. 2012.  
BENIGNI, R. Structure activity relationship studies of chemical mutagens and carcinogens mechanistic investigations and prediction approaches. **Chemical Reviews**, Washington, v. 105, n. 5, p. 1767-1800, Mar. 2005.

BERGAMASCHI, K. B. B. **Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento**. 2010. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

BORGES, M. H. et al. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: biochemistry and molecular biology**, Oxford, v. 127, n. 1, p. 21–30, Sept. 2000.

BORS, M. et al. Evaluation of the effect of *Uncaria tomentosa* extracts on the size and shape of human erythrocytes (*in vitro*). **Environmental toxicology and pharmacology**, Amsterdam, v. 33, n. 2, p. 127–134, Mar. 2012.

BOUKHEBTI, H. et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium L.* and *Mentha spicata L.* essential oils. **Der Pharmacia Lettre**, India, v. 3, n. 4, p. 267-275, 2011.

BRANDÃO, R. et al. Hemolytic effects of sodium selenite and mercuric chloride in human blood. **Drug and Chemical Toxicology**, New York, v. 28, n. 4, p. 397-407, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2. ed. rev. Brasília, 2001. 131 p. Disponível em:  
<[ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc\\_tec/zoo/manu\\_peco01.pdf](ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/zoo/manu_peco01.pdf)>. Acesso em: 10 dez. 2013.

BRITO, H. R. **Caracterização química de óleos essenciais de *Spondias mombin L.*, *Spondias purpurea L.* e *Spondias sp* (cajarana do sertão) Patos-PB-Brasil.** 2010. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2010.

BRUNETON, J. **Pharmacognosie-phytochimie des plantes medicinales.** London: Lavoisier Tech Doc, 1993. 915 p.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.

CABARKAPA, A. et al. Protective effect of dry olive leaf extract in adrenaline induced DNA damage evaluated using in vitro comet assay with human peripheral leukocytes. **Toxicology in Vitro**, New York, v. 28, n. 3, p. 451-456, Jan./Apr. 2014.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of Latin America.** New York: Cornell University, 1989.

CARDOSO, J. L. C. et al. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** São Paulo: Sarvier, 2003. p. 87-90.

CARVALHO, B. M. A. et al. Snake venom PLA<sub>2s</sub> inhibitors isolated from brazilian plants: synthetic and natural molecules. **BioMed Research International**, New York, v. 2013, Art. ID 153045, p. 1-8, Sept. 2013.

CHALAMAIAH, M. et al. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. **Food Chemistry**, Oxford, v. 135, n. 4, p. 3020-3038, 2012.

CHEESEMAN, K. H.; BEAVES, A.; ESTERBAUER, H. Hydroxyl-radical-induced iron catalysed degradation of 2-deoxyribose. Quantitative determination of malonaldehyde. **Biochemical Journal**, London, v. 252, n. 3, p. 649-653, June 1988.

COUNCIL DIRECTIVE. 88/388/EEC. The approximation of the laws of the member states relating to flavourings for use in foodstuffs and to source materials for their production. **Official Journal of the European Communities**, June 1988. 15.7.1988, L184/61–411 67. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/addit\\_flavor/flav09\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/addit_flavor/flav09_en.pdf)>. Acesso em: 15 dez. 2013.

COLLINS, A. R. et al. The comet assay: what can it really tell us? **Mutation Research**, Amsterdam, v. 375, n. 2, p. 183-193, Apr. 1997.

COLLINS, A. R. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 681, n. 1, p. 24-32, Jan./Feb. 2009.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair. Principles, applications, and limitation. **Reviews in Molecular Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249-261, 2004.

D'AOUST, J. Y. *Salmonella* Species. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. New Jersey: Hardcover, 2001. p. 129-157.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2<sup>nd</sup> ed. Ottawa: J. Wiley, 2002. 507 p.

DHAWAN, A.; BAYPAYEE, M.; PARMAR, D. The comet assay: a versatile tool for assessing DNA damage. In: DHAWAN, A.; ANDERSON, D. (Ed.). **The comet assay in toxicology issues in toxicology**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2009. p. 3-53. (Issues in Toxicology, 5).

DI PASQUA, R. et al. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 7, p. 2745-2749, Mar. 2006.

DIMITRI, M. J. **Enciclopédia Argentina de agricultura e jardineira**. 1. ed. Buenos Aires: ACME, 1980. p. 818.

DJENANE, D. et al. Antioxidant and antibacterial effects of *Lavandula* and *Mentha* essential oils in minced beef inoculated with *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* during storage at abuse refrigeration temperature. **Meat Science**, Berlin, v. 92, n. 4, p. 667-674, Dec. 2012.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, abr./jun. 2006.

FATTOM, A. I. et al. Development of StaphVax, a polysaccharide conjugate vaccine against *S. aureus* infection: from the lab bench to phase III clinical trials. **Vaccine**, Edinburgh, v. 22, n. 7, p. 880-887, Feb. 2004.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FRANCO, G. F. **Bioprospecção das partes aéreas e óleo essencial de *Liquidambar styraciflua L.*, Altingiaceae.** 2013. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

FREITAS, F. G. et al. Acute toxicity and biological activities of *Casearia grandiflora* aqueous extract (Flacourtiaceae): Phospholipase A<sub>2</sub>, myotoxic and lethal activities of venoms of *B. moojeni* and *B. Neuwied*. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 2, p. 95-103, May/Aug. 2005.

FUJIKAWA, H.; MOROZUMI, S. Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 3, p. 260-267, 2006.

GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P. Methods for the isolation and identification of *Listeria ssp* and *Listeria monoxytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, n. 5, p. 851-875, Sept. 2005.

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

GRAHAM, H. D. Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols. **Food Chemistry**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 801-805, May 1992.

GRAY, J. T. et al. Natural transmission of *Salmonella Choleraesuis* in swine. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 1, p. 141-146, Jan. 1996.

GRAZZIOTIN, F.; ECHEVERRIGARAY, S. Genetic Relationships Among Species of the Genus *Bothrops* Based on RAPD Markers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 3, p. 359-365, May 2005.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Óleo essencial de *Lippia sidoides* nativas de Minas Gerais: Composição, estruturas secretoras e atividade antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 45, n. 2, p. 267-275, abr./jun. 2014.

- HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; ARUOMA, O. I. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 165, p. 215-219, 1987.
- HUMPHREY, T. *Salmonella*, stress responses and food safety. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, n. 6, p. 504-509, June 2004.
- HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix. **Frontiers in Microbiology**, Colorado, v. 3, n. 12, Jan. 2012.
- JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.
- KALANTARI, H.; AZAR, J. H.; ELLIOTT, S. Study of the mutagenicity of "Hypiran" and "Sankol" in human blood cells and comparison with hydrogen peroxide by single cell gel electrophoresis (SCGE) or comet assay. **Drug Chemical Toxicology**, New York, v. 25, n. 2, p. 141-148, May 2002.
- KANATT, S. R.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. **Food Chemistry**, Oxford, v. 100, n. 2, p. 451-458, 2007.
- KHANUJA, S. P. S. et al. Assessment of genetic relationships in *Mentha* species. **Euphytica**, New York, v. 111, p. 121-125, 2000.
- KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon**, Oxford, v. 42, p. 827-840, 2003.
- KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, São Leopoldo, v. 5, n. 2, p. 120-132, maio/ago. 2010.
- LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 453-462, Sept. 2001.
- LOMONTE, B. et al. Neutralization of *Bothrops asper* venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment. **Toxicon**, Oxford, v. 54, n. 7, p. 1012-1028, Dec. 2009.

LU, Y.; FOOD, L. Y. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). **Food Chemistry**, Oxford, v. 75, n. 2, p. 197-202, 2001.

MAISTRO, E. L. et al. Genotoxicity and mutagenicity of *Rosmarinus officinalis* (Labiatae) essential oil in mammalian cells in vivo. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 4, p. 2113 -2122, Oct. 2010.

MARCUSSI, S. et al. M. Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes. Mutation Research. **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, New York, v. 724, n.1/2 p. 59-63, 2011.

MARYA, C. M. et al. In vitro inhibitory effect of clove essential oil and its two active principles on tooth decalcification by apple juice. **International Journal of Dentistry**, Cairo, v. 2012, Art. ID 759618, p. 1-6, Jan. 2012.

MISHARINA, T. A. et al. Effects of low doses of essential oils on the antioxidant status of the erythrocytes, liver and the brain of mice. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 50, n. 1, p. 88-93, 2014.

MIGUEL, G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 12, p. 9252-9287, Dec. 2010.

MIMICA-DUKIĆ, N. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oil. **Plant Medica**, Stuttgart, v. 69, n. 5, p. 413-419, 2003.

MIMICA-DUKIĆ, N. et al. Essential oil of *Myrtus communis* L. as a potential antioxidant and antimutagenic agents. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 4, p. 2759-2770, 2010.

MKADDEM, M. et al. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of *Mentha (longifolia* L. and *viridis*) essential oils. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 74, n. 7, p. 1750-3841, 2009.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**: approved standard. 6<sup>nd</sup> ed. Wayne, 2003. (NCCLS Document M7-A6; NCCLS, 940).

NIKI, E. et al. Membrane damage due to lipid oxidation. **The American Journal Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 53, n. 1, p. 201S-205S, Jan. 1991.

OGUNWANDE, I. A. et al. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **International Journal of Aromatherapy**, Hove, v. 15, n. 3, p. 152-147, 2005.

OLIVEIRA, C. C. **Estudo toxicológico pré-clínico do extrato aquoso e do óleo essencial das folhas de *Alpinia zerumbet* (pers.) Burtt & Smith**. 2008. 91p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

OLIVEIRA, R. A. et al. Constituintes voláteis de *Mentha pulegium* L. e *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 165-169, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Quality control methods for medicinal plants methods**. Genebra, 1998. p. 41-43.

OUTBREAK of listeriosis associated with homemade Mexican-Style cheese North Carolina, October 2000-January 2001. (MMWR, 50:560-562, 2001). JAMA, 286 (6): 664-665, 2001. [online]. Disponível em: <<http://www.gateway2.ovid.com/ovidweb.cgi>>. Acesso em: 28 nov. 2012.

PAPARELLA, A. et al. Flow cytometric assessmet of antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 12, p. 1174-1182, Dec. 2008.

PAYMENT, P.; RILEY, M. S. Resolving the global burden of gastrointestinal illness: a call for action. **American Academy of Microbiology**. Washington, 2002. Disponível em: <<http://www.asm.org>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

PEREIRA, A. A. et al. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, maio/jun. 2008.

PÉRES, V. F. et al. Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 9, p. 2389-2395, 2009.

PIDDE-QUEIROZA, G. et al. Human complement activation and anaphylatoxins generation induced by snake venom toxins from *Bothrops* genus. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 47, n. 16, p. 2537-2544, Oct. 2010.

PIMENTEL, F. A. et al. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, mar./abr. 2006.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 24-29, 2001.

PRICE, M. F; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Abingdon, v. 20, n. 1, p. 7-17, 1982.

PRIETO, P.; PINEDA, M. E.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, Canterbury, v. 269, n. 2, p. 337-341, May 1999.

QUINTANS, J. S. S. et al. Chemical constituents and anticancer effects of the essential oil from leaves of *Xylopiya laevigata*. **Planta Medica**, New York, v. 79, n. 2, p. 123-130, Jan. 2013.

RANGEL, M. et al. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, Oxford, v. 35, n. 2, p. 305-309, 1997.

RASFF Food Alerts, Week 7. Disponível em:  
<<http://www.haccpeuropa.com/2014/02/17/rasff-food-alerts-week-7>>. Acesso em: 14 fev. 2014.

RASSOULI, F. B. et al. Investigating the cytotoxic and apoptosis inducing effects of monoterpenoid stylosin in vitro. **Fitoterapia**, Milano, v. 82, n. 5, p. 742-749, July 2011.

RAZAVI, S. M. et al. Coumarins from the aerial parts of *Prangos coleoptera* (Apiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 1, p. 1-5, jan./mar. 2008.

RODRIGUES, L. et al. Trichomes micromorphology and essential oil variation at different developmental stages of cultivated and wild growing *Mentha pulegium* L. populations from Portugal. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 43, p. 692-700, May 2013.

ROSENTHAL, R. et al. Intestinal ischemia after bushmaster (*Lachesis muta*) snakebite - a case report. **Toxicon**, Oxford, v. 40, n. 2, p. 217-220, 2002.

RUBERTO, G; BARATTA, M. T. Antioxidante activity of selected essential oil components in two lipid model system. **Food Chemistry**, Oxford, v. 69, n. 2, p. 167-174, May 2000.

RUFINO, M. S. M. et al. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS+. Fortaleza: Embrapa, 2007. 4 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 128). Disponível em: <[http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/Cot\\_128.pdf](http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/Cot_128.pdf)>. Acesso em: 12 jan. 2014.

SAAD, N. Y.; MULLER, C. D.; LOBSTEIN, A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 20, n. 5, p. 269-279, Sept. 2013.

SALARBASHI, D. et al. Development of new active packaging film made from a soluble soybean polysaccharide incorporated *Zataria multiflora* Boiss and *Mentha pulegium* essential oils. **Food Chemistry**, Oxford, v. 146, p. 614–622, 2014.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, V. M. C. S. et al. Alternativas de propagação na produção de óleo essencial de *Mentha canadensis* L. no Litoral Norte Catarinense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 97-102, 2012.

SCHMID, M. W. et al. Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 28, n. 1, p. 1-18, Jan. 2005.

SHAHMOHAMADI, R. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of flowering aerial parts *Mentha Pulegium* from gilán. **Pharmacology Online**, Salerno, v. 3, p. 651-659, 2011. Disponível em: <<http://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2011/vol3/068.sariri.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

SILVA, E. R. et al. Capacidade antioxidante e composição química de grãos integrais de gergelim creme e preto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 7, p. 736-742, jul. 2011.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. S.(Org.). **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. 422 p.

SILVA, N. C. et al. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. **Natural Product Research**, London, v. 26, n. 16, p. 1510-1514, Oct. 2011.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007.544 p.

SILVEIRA, A. C. B. et al. Caracterização fisiológica de culturas não monocelulares e monocelulares de espécies de *Malassezia*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 4, p. 213-216, jul. 2006.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007. 1104 p.

SINGH, H. P. et al. Characterization and antioxidant activity of essential oils from fresh and decaying leaves of *Eucalyptus tereticornis*. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 57, n. 15, p. 6962-6966, 2009.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 175, n. 1, p. 184-191, Mar.1988.

SINGH, T.; SINGH, A. P. A review on natural products as wood protectant **Wood Science and Technology**, New York, v. 46, n. 5, p. 851–870, Sept. 2012.

SINHA, S.; BISWAS, D.; MUKHERJEE, A. Antigenotoxic and antioxidant activities of palmarosa and citronella essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1521-1527, 2011.

SOARES, A. M. et al. Neutralizing effects of Brazilian plants against snake venoms. **Drugs of the Future**, Barcelona, v. 29, n. 11, p. 1105–1117, 2004.  
SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOLORZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 23, n. 2, p. 136-141, Apr. 2012.

STENGELE, M.; STAHL-BISKUP, E. Seasonal variation in the essential oil of European pennyroyal (*Mentha pulegium* L.). **Acta Horticultura**, Belgium, v. 344, n. 1, p.41-51, 1993.

TEBALDI, V. M. R. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru proveniente de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 3, p. 753-760, jul./set. 2008.

TERRA, A. L. C.; LEMA, T. Comparação da toxicidade entre peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*\* presentes nas regiões sul e sudeste do Brasil (\*Serpentes, Viperidae). **Revista Brasileira de Toxicologia**, Salvador, v. 20, n. 1/2, p. 55-63, dez. 2007.

TUSHAR; B. S.; SARMA, G. C.; RANGAN, L. Ethnomedical uses of Zingiberaceous plants of Northeast India. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 132, n. 1, p. 286-296, Oct. 2010.

WANG, H. T. et al. Analysis of genetic variability and relationships among *Mentha* L. using the limonene synthase gene, LS. **Gene**, Campinas, v. 524, n. 3, p. 246-252, July 2013.

YAMAGUCHI, K. K. L.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Atividades biológicas dos óleos essenciais de *Endlicheria citriodora*, uma lauraceae rica em geranato de metila. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 6, p. 826-830, 2013.