



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RYAN DA SILVA RAMOS

ESTUDO FITOQUÍMICO E DA ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA, DE
CITOTOXICIDADE E LARVICIDA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DA
FAMÍLIA LAMIACEAE (LAMIALES)

Macapá
2014

RYAN DA SILVA RAMOS

**ESTUDO FITOQUÍMICO E DA ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA, DE
CITOTOXICIDADE E LARVICIDA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DA
FAMÍLIA LAMIACEAE (LAMIALES)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá - UNIFAP, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Biologia Farmacêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Sheylla Susan Moreira da Silva de Almeida.

**Macapá
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

615.19

R175e

Ramos, Ryan da Silva.

Estudo fitoquímico da atividade microbiológica de citotoxicidade e larvicida dos óleos essenciais de espécies da família Lamiaceae (LAMIALES) / Ryan da Silva Ramos, orientadora Sheylla Susan Moreira da Silva de Almeida. – Macapá, 2014.

86 f.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Quimiotipo. 2. Quimiotaxonomia. 3. Bioatividade. 4. Óleo essencial.
I. Almeida, Sheylla Susan Moreira da Silva de, orient. II. Fundação
Universidade Federal do Amapá. III. Título.

RYAN DA SILVA RAMOS

**ESTUDO FITOQUÍMICO E DA ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA, DE
CITOTOXICIDADE E LARVICIDA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DA
FAMÍLIA LAMIACEAE (LAMIALES)**

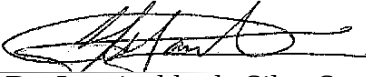
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá - UNIFAP, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Biologia Farmacêutica.

Data da Avaliação: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Sheylla Susan Moreira da Silva de Almeida
Universidade Federal do Amapá/PPGCF (Orientadora)



Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos
Universidade Federal do Pará-UFPA

Prof. Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto
Universidade Federal do Amapá/PPGCS (Membro)

Prof. Dr. Henrique Duarte Fonseca Filho
Universidade Federal do Amapá/PPGCF (Suplente)

*Dedico este título aos meus pais, irmãos,
familiares em geral e amigos,
por todo apoio nessa conquista.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS por ter me concedido a vida, e amor, carinho e força em sempre seguir na vida.

A minha orientadora Profa. Dra. Sheylla Susan Moreira da Silva de Almeida a quem tenho profunda admiração, respeito e carinho, nos quais seus ensinamentos foram indispensáveis para construção de minha formação.

A Universidade Federal do Amapá-UNIFAP e o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas- PPGCF pela estrutura necessária para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Raullyan Borja Lima e Silva do Instituto de Estudos e Pesquisas Científicas do Amapá/IEPA pela indicação das espécies do estudo.

Ao Prof. Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto do Laboratório de Arthropoda da Universidade Federal do Amapá-UNIFAP, pela realização dos bioensaios e aos colaboradores Profa. Msc. Ledayanne, Prof. Msc. Ricardo e Karen.

A Profa. Msc. Rosangela do Socorro Rodrigues Sarquis do Instituto de Estudos e Pesquisas Científicas do Amapá/IEPA e seus alunos Diego Sales e Ana Paula Rodrigues, pela realização das atividades Microbiológicas.

Ao Prof. Dr. Henrique Duarte Fonseca Filho pelas contribuições e sugestões na banca de qualificação.

Aos amigos e em especial do mestrado Alex Lobato, Josivan Costa e Francenilda Gibson por todo incentivo e companheirismo durante esses dois anos.

Aos amigos de turma pelas experiências acadêmicas e profissionais compartilhadas.

Aos companheiros(as) do Laboratório de Farmacognosia e Fitoquímica Rangel, Felipe, Aline, Braian, Raimundo Neto, Sarah, Amanda, Yane, Gracenildo, Suelen, Dayane, Ester, Antônio, Erick, Brenda, Diana e Elda, por toda amizade.

Aos meus pais Edna Maria e Ronildo Ramos pelo incentivo, apoio e amor durante toda minha vida, fonte de inspiração para alcançar meus objetivos.

Aos meus irmãos Michel, Thaiane e Ruan por sempre acreditarem em meu potencial.

Ao meu sobrinho Íthalo Gabriel por ser fonte de alegria e inspiração na minha vida.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amapá através do projeto do PPSUS pelo financiamento.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Agradeço a todos que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho.
O meu muito obrigado.

“O futuro pertence aqueles que acreditam na beleza seus sonhos”

Autor desconhecido

RESUMO

O objetivo da pesquisa foi realizar estudo químico e biológico dos óleos essenciais de espécies da família Lamiaceae *Rosmarinus officinalis* Linn., *Ocimum gratissimum* Lineu, *Ocimum micranthum* Willd, *Ocimum basilicum* Linn., *Mentha piperita* Linn., *Mentha pulegium* Linn., *Mentha spicata* Linn., *Pogostemon heyneanus* Benth e *Hyptis crenata* (Pohl) ex Benth. Os óleos essenciais foram obtidos pelo método de hidrodestilação através de aparelho tipo Clevenger e acondicionados em frasco âmbar e posteriormente enviados para realização das análises de seus constituintes químicos por CG-EM. Neste estudo a atividade antioxidante (%AA) foi avaliada pelos métodos de sequestro dos radicais DPPH, indispensável para o controle de qualidade de óleos essenciais. A análise de atividade de citotóxicidade dos óleos essenciais foi realizada frente às larvas de *A. salina* em diferentes concentrações (1250, 1000, 500, 250, 100, 10 e 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) para determinação de CL_{50} . Os óleos essenciais foram testados em larvas do terceiro estágio de desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti*. As larvas foram expostas em triplicatas a diferentes concentrações (500, 400, 300, 200 e 130 ppm). Na avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi empregado o método de disco difusão em ágar, contra as cepas bacterianas de 2 linhagens uma gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e gram-negativa (*Escherichia coli*). As substâncias foram identificadas pelas análises dos espectros de massas, comparação com dados obtidos da biblioteca do equipamento e por meio de cálculos de seus índices de Kovats. Em sua maior ocorrência relativa classificaram-se como hidrocarbonetos monoterpênicos e oxigenados (α -felandreno, *p*-Cimeno, Carvacrol e 1,8-Cineol). Na atividade antioxidante apenas as espécies *O. basilicum*, *M. piperita*, *M. pulegium* e *P. heyneanus* apresentaram %AA na concentração de 5 mg.mL^{-1} de $67,4\pm 1,1$; $79,9\pm 1,7$; $56,0\pm 0,2$; $89,4\pm 0,3\%$ e CI_{50} na concentração de e 2,83; 0,54; 7,7; e 1,8 mg.mL^{-1} , respectivamente. Na atividade citotóxica todos os óleos essenciais se mostram tóxicos frente às larvas de *A. salina*, pois os valores de $\text{CL}_{50} < 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ são considerados bioativos. Os óleos essenciais de *O. gratissimum*, *O. basilicum*, *M. spicata* e *H. crenata* apresentaram expressivos halos de inibição na concentração de 100 mg.mL^{-1} contra *S. aureus* de $10\pm 0,0$, $11,3\pm 0,6$, $11,5\pm 0,5$ e $13,6\pm 0,6$ mm, respectivamente; e todos os óleos essenciais se mostram sensíveis e com halos de inibições expressivos contra *E. coli*. No bioensaio de atividade larvívora os óleos essenciais de *O. gratissimum*, *O. basilicum*, *P. heyneanus* e *H. crenata* mostraram-se potencialmente bioativos em larvas do *A. aegypti*, devido os resultados de $\text{CL}_{50} < 100$ ppm.

Palavras-chave: Quimiotipo, Quimiotaxonomia, Bioatividade, Óleo essencial.

ABSTRACT

The objective of the research was to perform chemical and biological study of the essential oils of species of Lamiaceae family *Rosmarinus officinalis* Linn., *Ocimum gratissimum* Lineu, *Ocimum micranthum* Willd, *Ocimum basilicum* Linn., *Mentha piperita* Linn., *Mentha pulegium* Linn., *Mentha spicata* Linn., *Pogostemon heyneanus* Benth e *Hyptis crenata* (Pohl) ex Benth. The essential oils were obtained by hydro-distillation method by Clevenger type apparatus and conditioned in amber bottle and later sent to perform the analyzes of its chemical constituents by GC-MS. In this study the antioxidant activity was evaluated by scavenging methods of DPPH radicals. The cytotoxic activity analysis of essential oils was performed forward to the *A. salina* larvae in different concentrations (1250, 1000, 500, 250, 100, 10 e 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) to determine LC_{50} . The essential oils were tested on larvae of the third stage of development of the mosquito *Aedes aegypti*. The third instar larvae were exposed in triplicate at different concentrations (500, 400, 300, 200 and 130 ppm). In evaluating the antimicrobial activity of the essential oils was used disc agar diffusion method, against two bacterial strains of a gram-positive strains (*Staphylococcus aureus*) and Gram-negative (*Escherichia coli*). The substances were identified by analysis of mass spectra, compared to data obtained from the library of the equipment and by calculation of their Kovats index. For the most relative occurrence were classified as monoterpene hydrocarbons and oxygenates (α -phellandrene, p-cymene, Carvacrol and 1.8-Cineol). The antioxidant activity only species *O. basilicum*, *M. piperita*, *M. pulegium* and *P. heyneanus* presented (% AA) and IC_{50} at a concentration of 5 mg.mL^{-1} 67.4 ± 1.1 and 2.83; 79.9 ± 1.7 and 0.54; 56.0 ± 0.2 and 7.7; $89.4 \pm 0.3\%$ and 1.8 mg.mL^{-1} , respectively. In cytotoxic activity all essential oils are shown toxicity in the larvae of *A. salina*, because LC_{50} values $<1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ are considered bioactive. The essential oils *O. gratissimum*, *O. basilicum*, *M. spicata* and *H. crenata* showed significant inhibition zones at a concentration of 100 mg.mL^{-1} against *S. aureus* of 10 ± 0.0 , 11.3 ± 0.6 , 11.5 ± 0.5 and 13.6 ± 0.6 mm, respectively; and all essential oils are sensitive and halos of expressive inhibitions against *E. coli*. In the bioassay larvicidal activity of essential oils *O. gratissimum*, *O. basilicum*, *P. heyneanus* and *H. crenata* shown to be potentially bioactive in *A. aegypti* larvae, because the results of $\text{LC}_{50} <100$ ppm.

Keywords: Chemotype; Chemotaxonomy, Bioactivity, Essential Oils.

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

µg – micrograma

µL – microlitro

µm – micrômetro

%AA - Porcentagem de Atividade Antioxidante

ABRAPOE – Associação Brasileira de Produtores de Óleos Essenciais

CI₅₀ – Concentração Inibitória 50%

CG – Cromatografia Gasosa

CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas

CL₅₀ – Concentração Letal que causa mortalidade de 50% dos indivíduos

cm – centímetro

CONTRADE – United Nation Commodity Trade Statistics Database

DMSO – Dimetilsufóxido

eV – eletrovolt

IK – Índice de Kovats

ISO – International Standart Organization

m – metro

mg – miligrama

mL – mililitro

mm – milímetro

nm – nanômetro

OE – Óleos Essenciais

p. – página

s/n – sem número

SUS - Sistema Único de Saúde

UE – União Européia

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Espécies vegetais pertencentes à família Lamiaceae.....	25
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Cromatograma obtido por CG do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> . Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 60 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 3 °C/min. até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 30,0 min.....	34
Figura 2 - Espectros de massas do óleo essencial obtidos por CG-EM em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento.....	35
Figura 3- Fragmentos iônicos típicos do 1,8-Cineol.....	37
Figura 4- Cromatograma obtido por CG do óleo essencial de <i>O. migranthurum</i> . Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 60 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 3 °C/min. até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 30,0 min.....	38
Figura 5 - Espectros de massas do óleo essencial obtidos por CG-EM em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento.....	38
Figura 6- Cromatograma obtido por CG do óleo essencial de <i>O. gratissimum</i> . Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 60 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 3 °C/min. até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 30,0 min.....	39
Figura 7 - Espectros de massas do óleo essencial obtidos por CG-EM em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento.....	40
Figura 8- Cromatograma obtido por GC-MS do óleo essencial de <i>O. basilicum</i> . Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 60 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 3 °C/min. até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 30,0 min.....	42
Figura 9 - Espectros de massas do óleo essencial obtidos por CG-EM em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento.....	43
Figura 10- Fragmentação do limoneno pela reação de <i>retro</i> -Diels-Alder.....	45
Figura 11- Perfil de fragmentação do Linanol.....	46
Figura 12- Cromatograma obtido por CG do óleo essencial de <i>M. piperita</i> . Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 60 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 3 °C/min. até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 30,0 min.....	47

Figura 13 - Espectros de massas do composto majoritário do óleo essencial obtidos por CG-EM em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento.....	47
Figura 14 - Cromatograma obtido por CG do óleo essencial de <i>M. pulegium</i> . Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 60 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 3 °C/min. até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 30,0 min.....	48
Figura 15 - Espectros de massas do óleo essencial obtidos por CG-EM em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento.....	49
Figura 16 - Cromatograma obtido por CG do óleo essencial de <i>P.heyneanus</i> . Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 60 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 3 °C/min. até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 30,0 min.....	50
Figura 17 - Espectros de massas do óleo essencial obtidos por CG-EM em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento.....	50
Figura 18 - Cromatograma obtido por CG do óleo essencial de <i>H. crenata</i> . Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 60 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 3 °C/min. até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 30,0 min.....	51
Figura 19 - Espectros de massas do óleo essencial obtidos por CG-EM em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Compostos identificados pelo IK do OE de <i>R. officinalis</i> . Os tR (min.) foram obtidos por CG-EM	37
Tabela 2- Compostos identificados como monoterpenos do OE de <i>O. migranthurum</i> . Os tR (min.) foram obtidos por CG-EM.....	39
Tabela 3 - Compostos identificados como monoterpenos do OE de <i>O. gratissimum</i> . Os tR (min.) foram obtidos por CG-EM.....	41
Tabela 4- Compostos identificados como monoterpenos do OE de <i>O. basilicum</i> . Os tR (min.) foram obtidos por CG-EM.....	44
Tabela 5- Compostos identificados como monoterpenos do OE de <i>M. piperita</i> . Os tR (min.) foram obtidos por CG-EM.....	48
Tabela 6- Compostos identificados do OE de <i>M. pulegium</i> . Os tR (min.) foram obtidos por CG-EM.....	49
Tabela 7- Composto identificado do OE de <i>M. spicata</i> . Os tR (min.) foram obtidos por CG-EM.....	49
Tabela 8- Compostos identificados como monoterpenos do OE de <i>P. heyneanus</i> . Os tR (min.) foram obtidos por CG-EM.....	50
Tabela 9- Compostos identificados como monoterpenos do OE de <i>H. crenata</i> . Os tR (min.) foram obtidos por CG-EM.....	53
Tabela 10- Resultados das atividades antioxidantes dos óleos essenciais.....	54
Tabela 11 - Resultados do teste de toxicidade dos óleos essenciais da espécie da família Lamiaceae frente às larvas de <i>Artemia salina</i>	57
Tabela 12- Resultados de medição dos halos de inibição dos óleos essenciais de espécies da família Lamiaceae contra cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	61
Tabela 13- Resultados de medição dos halos de inibição dos óleos essenciais de espécies da família Lamiaceae contra cepas de <i>Escherichia coli</i>	62
Tabela 14 - Resultados da Atividade larvicida do óleo essencial da espécie da família Lamiaceae frente às larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	67

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS	19
3.2 ÓLEOS ESSENCIAIS (OE)	20
3.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	23
3.4 ESTUDO QUÍMICO E ENSAIO BIOLÓGICO	24
3.5 A FAMÍLIA LAMIACEAE E ESPÉCIES DE ESTUDO	25
3.5.1 <i>Rosmarinus officinalis</i> Linn.	26
3.5.2 <i>Ocimum gratissimum</i> Lineu.	27
3.5.3 <i>Ocimum micranthum</i> Willd	28
3.5.4 <i>Ocimum basilicum</i> Linn.	28
3.5.5 <i>Mentha piperita</i> Linn.	28
3.5.6 <i>Mentha pulegium</i> Linn.	29
3.5.7 <i>Mentha spicata</i> Linn.	29
3.5.8 <i>Pogostemon heyneanus</i> Benth	30
3.5.9 <i>Hyptis crenata</i> (Pohl) ex Benth	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 COLETA DAS ESPÉCIES	31
4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	31
4.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	31
4.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	32
4.5 TESTE DE TOXICIDADE	32
4.6 ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA	33
4.6.1 Meios de cultura	33
4.6.2 Suspensão bacteriana e inóculo	33
4.6.3 Avaliação da atividade antimicrobiana	33
4.7 ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL	34
4.7.1 Larvas	34

4.7.2 Bioensaios	34
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 ANÁLISE QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS POR CG-EM.....	35
5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	54
5.3 TESTE DE TOXICIDADE	58
5.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	62
5.5 ATIVIDADE LARVICIDA	67
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
 REFERÊNCIAS.....	 75

1 INTRODUÇÃO

A família Lamiaceae apresenta potencialidade para obtenção de Óleos Essenciais (OE) e possui importância em vários setores econômicos, desde a indústria farmacêutica, perfumaria, cosmética até a alimentícia. Diversas funções biológicas são associadas às espécies pela medicina popular, utilizadas para o tratamento de queimaduras, dor de cabeça, cólica, febre, e possuem relatos de atividades antigripal, antivomitiva, carminativa, inseticida, repelente, antibacteriana e combate a parasitas intestinais.

O cultivo de plantas medicinais com utilização tradicional envolve a possibilidade de domesticação da espécie, sugerindo domínio tecnológico de todas as etapas de desenvolvimento, forma de propagação, adaptação ao ambiente de cultivo e forma de crescimento, contudo o extrativismo tem provocado reduções drásticas das populações naturais de plantas medicinais da flora nativa.

O Brasil ocupa lugar de destaque na produção de OE, junto com Índia, China e Indonésia que são considerados os quatro grandes produtores mundiais. Os OE possuem aplicação na indústria de perfumaria (aromas, fixadores e fragrâncias), alimentar (condimentos), cosméticas e coadjuvantes em formulações de medicamentos. A ação dos óleos essenciais está na capacidade de proteção do sistema biológico a ataques e processos oxidativos (ânions superóxidos). Observa-se este efeito nas membranas lipídicas que protegem dos danos produzidos pelo estresse oxidativo, considerando a principal causa do envelhecimento precoce, das doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e das células tumorais.

A região amazônica, com a sua imensa biodiversidade, oferece grande potencial na descoberta de novos aromas e produtos, sendo o estado do Amapá, detentor de uma rica flora aromática, onde as plantas são utilizadas rotineiramente como remédio e amplamente comercializadas localmente. No entanto, observa-se grande escassez de informações químicas e atividades biológicas associadas a espécies oleaginosas da família Lamiaceae, desde a constituição química dos compostos majoritários a ações farmacológicas dos óleos essenciais.

Há uma grande dificuldade na classificação de plantas dessa família, pois as análises de estômatos e cromossomos tem se mostrado inconsistente. Desse modo, a inserção de classificação quimiosistemática ajudaria na identificação, através do estudo dos constituintes químicos presentes em seus óleos essenciais, pois a presença de metabólitos secundários são fatores que determinam a posição de uma espécie em um determinado taxô.

A importância da classificação de cada espécie está diretamente relacionada com sua correta utilização, evitando dessa forma o uso errôneo pelas comunidades que as utilizam e as comercializam.

Os OE desempenham papel de auxílio à sobrevivência do vegetal em seu ecossistema, no combate a microrganismo e predadores ou na atração de agentes fecundadores e polinizadores, no entanto, para que seja um produto natural seguro se faz necessário o estudo de sua toxidez. A investigação química de seus constituintes fornece informações para identificação e quantificação que pode ser associada à atividade que o vegetal venha apresentar, podendo gerar benefícios para problemas que acompanham a sociedades desde tempos antigos.

As doenças ditas negligenciadas, tais como a dengue, que atingem a população em todo mundo, especialmente em países com baixa qualidade de vida e falta de saneamento básico, como por exemplo, o Brasil onde a dengue vem vitimando e causando morte de milhares de pessoas. Dessa forma, o poder público vem apoiando o uso e a inserção de fitoterápicos ao sistema público de saúde para dar qualidade no atendimento primário da população.

Portanto, o estudo visa coletar informações dos constituintes químicos majoritários e verificar algumas ações biológicas dos óleos essenciais de espécies da família Lamiaceae, onde regionalmente permeia o grande desafio de se conhecer as potencialidades da região amazônica e agregar valor aos produtos da sua biodiversidade, e resgatar conhecimento de cunho popular em encontrar um modelo de desenvolvimento econômico que favoreça o desenvolvimento regional e a conservação da sua biodiversidade, com influência direta na melhoria da qualidade de vida das populações locais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

✓ Realizar estudo químico e biológico dos óleos essenciais de espécies da família Lamiaceae *Rosmarinus officinalis* Linn., *Ocimum gratissimum* Lineu, *Ocimum micranthum* Willd, *Ocimum basilicum* Linn., *Mentha piperita* Linn., *Mentha pulegium* Linn., *Mentha spicata* Linn., *Pogostemon heyneanus* Benth e *Hyptis crenata* (Pohl) ex Benth.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obter os óleos essenciais pelo método tradicional de hidrodestilação;
- ✓ Analisar a composição química dos óleos essenciais de espécies da família Lamiaceae por cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massa;
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante dos óleos essenciais;
- ✓ Realizar bioensaio toxicológico dos óleos essenciais frente às larvas de *Artemia salina* L.;
- ✓ Realizar teste *in vitro* de atividade antibacteriana dos óleos essenciais contra linhagens de bactérias (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*).
- ✓ Determinar o potencial larvicida dos óleos essenciais contra larvas de *Aedes aegypti*;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais e seus derivados para o tratamento de enfermidades é uma prática antiga, e que atualmente encontra-se em expansão por todo mundo (SILVA, 2002; LOPES et al., 2010). No Brasil estima-se que o comércio de fitoterápicos seja da ordem de 5% do mercado total de medicamentos, avaliado em mais de 400 milhões (BARETO, 2011). Nesse contexto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80% da população dependam da medicina tradicional, em especial nos países emergentes. A fitoterapia tem surgido como uma opção medicamentosa bem aceita e acessível aos povos do mundo, e no caso do Brasil é agradável para as necessidades locais de centenas de municípios no atendimento primário à saúde (MELO et al., 2007).

Estima-se que existam 350 mil espécies vegetais no mundo, em que apenas 10% destas tenham sido estudadas e avaliadas quanto às propriedades farmacológicas. Desse modo, o Brasil ganha destaque apresentando a maior biodiversidade vegetal do planeta e uma rica fonte de novos fármacos. Resultado este, em parte, da miscigenação cultural envolvendo africanos e europeus que motivou a introdução de espécies exóticas. Por outro lado, destaca-se a herança da cultura ameríndia no uso de plantas vegetais, que ainda são poucas estudadas (MG BIOTA, 2008).

Como consequência de grande difusão, manejo e utilização das plantas medicinais, há ampla produção de produtos à base de espécies vegetais por indústrias, em suas diversas formas farmacêuticas que são comercializadas em farmácias, supermercados e casas de produtos naturais. Entretanto, Jesus e Cunha (2012) afirmam que fatores como a baixa qualidade e padronização dos produtos, o uso errôneo de espécies e adulterações, os contaminantes tóxicos, o uso indevido e as superdosagens motivam uma preocupação das autoridades sanitárias em relação à segurança, eficácia e qualidade da droga vegetal.

A atividade funcional de um produto natural vem despertando o interesse popular e institucional no sentido de fortalecer o uso de plantas medicinais em suas diversas formas farmacêuticas, definida pela fitoterapia, sem a utilização de compostos isolados. No Brasil na década de 80 desperta-se o interesse de inserir fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS), no entanto, só em meados de 2006 torna-se aprovado a Política Nacional de Produtos Naturais e Fitoterápicos pelo decreto 5.833 de 22 de junho do mesmo ano (FERRONATTO et al., 2007).

3.2 ÓLEOS ESSENCIAIS (OE)

A International Standart Organization (ISO) define os Óleos Essenciais (OE) ou Voláteis como produtos obtidos de partes de plantas que são extraídos através da técnica de arraste a vapor, na grande maioria das vezes, e também pela prensagem do pericarpo de frutos cítricos, que no Brasil dominam o mercado de exportação da área. Geralmente são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas. Estão associados a várias funções necessárias à sobrevivência do vegetal em seu ecossistema, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos e predadores, e também na atração de insetos e outros agentes fecundadores. Na medicina popular, os óleos essenciais possuem uma larga tradição de uso (MORAIS, 2009; COSTA et al., 2010).

O Brasil se destaca na produção mundial de Óleos Essenciais, no entanto, sofre problemas crônicos como falta de manutenção do padrão de qualidade dos óleos, representatividade nacional e baixos investimentos governamentais no setor, que a este se encontra em quadro estacionário. Recentemente foi fundada a Associação Brasileira de Produtos de Óleos Essenciais (ABRAPOE) que busca colaborar na aproximação entre produtores e os centros de pesquisas nacionais para agregar qualidade aos óleos por meio de pesquisa e estudos de padronização, fornecer dados atualizados de mercado e representar a área frente aos órgãos e programas governamentais (BIZZO et al., 2009).

Nos OE sua principal característica química é a volatilidade, diferenciando-se, assim, dos óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas, obtidas geralmente de sementes. Nesse sentido, outra propriedade importante é o aroma agradável e intenso da maioria dos óleos voláteis, também chamados de essências. Em sua composição química apresentam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos de enxofre. O perfil terpênico apresenta normalmente substâncias constituídas de moléculas de dez e de quinze carbonos (monoterpenos e sesquiterpenos), mas dependendo do método de extração e da composição da planta, terpenos menos voláteis podem aparecer na composição do óleo essencial (OLIVEIRA et al., 2006; SIMÕES et al., 2010).

Os óleos voláteis são raramente encontrados em gimnospermas (exceção de coníferas). Em angiosperma monocotiledôneas, a ocorrência é relativamente rara, com exceção de Poaleae (especialmente espécies de *Cymbopogon* e *Vitiveria*) e Zingiberaceae (espécie de *Alpinia* e *Curcuma*, dentre outras). No entanto, as plantas ricas em óleos voláteis são abundantes em angiospermas dicotiledôneas, tais como nas famílias Asteraceae, Apiaceae,

Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Piperaceae, Rutaceae (SIMÕES et al., 2010).

Flores, folhas, cascas, rizomas e frutos são matérias-primas para sua produção, a exemplo dos óleos essenciais de roseiras, eucalipto, caneleiras, gengibre e laranjeiras, respectivamente. Possuem grande aplicação na perfumaria, cosmética, alimentos e como coadjuvantes em medicamentos. São empregados principalmente como aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias, em composições farmacêuticas e comercializados na sua forma bruta ou beneficiada, fornecendo substâncias purificadas como o limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol (MORAIS et al., 2006; POTZERNHEIM; BIZZO; VIEIRA, 2006).

Lima et al. (2006) afirmam que tem-se estabelecido em pesquisas que cerca de 60% da composição dos óleos essenciais possuem ação antifúngica e 35% exibem propriedades antibacterianas. A composição química e concentração dos óleos essenciais dependem do clima, da estação do ano, condições geográficas, período de colheita e a técnica de destilação, tais ocorrências podem causar variabilidade no teor dos mesmos. Eles podem apresentar ação tanto contra bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas e ainda leveduras e fungos filamentosos. Ainda que indústrias farmacêuticas venham produzindo um número de novos antibióticos nas últimas três décadas, tem aumentado a resistência de microrganismos para essas drogas. Em geral, bactérias competem entre si no seu habitat, e através da seletividade tornam-se imunes aos antibióticos que são utilizadas como agentes terapêuticos (BERTINI et al., 2005; MORAIS, 2009).

Dessa forma, a exploração da biodiversidade vegetal, quando o órgão representa um substrato renovável (ex: resina, folha, flor, fruto, semente), é possível extrair-se a essência sem eliminar a planta. Isso torna uma fonte de óleo essencial ecologicamente correta. Logo, a grande parte dos óleos essenciais mundialmente comercializados é atualmente oriunda de cultivos racionalizados e, sempre que possível estabilizado genética e climaticamente, o que garante a reprodutibilidade do perfil químico do produto (SANTOS et al., 2010).

Nesse contexto, Gomes e Favero (2011) avaliaram o potencial inseticida do óleo essencial das plantas *Anacardium humile* A.St.Hil (Cajuzinho-do-Campo), *Cymbopogon nardus* L. R. (Citronela), *Ocimum gratissimum* L. (Alfavaca) e *Eucalyptus urograndis* em ninfas do 3º e 4º estádios de desenvolvimento de *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) e constataram que o óleo essencial de *E. urograndis* mostrou-se promissor para a aplicação por fumigação, apresentando 100% de mortalidade para as ninfas de *T. infestans*, devido a eficiência do óleo em penetrar em pequenos orifícios e agir nas vias respiratórias.

O uso da técnica de fumigação ou de volatilização com óleo extraído de várias espécies vegetais com potencial inseticida, para o controle de pragas de grãos armazenados, tem sido nos últimos anos bastante difundida em diversos países. No Brasil, devido à riqueza e abundância de espécies vegetais, pode ser considerado um celeiro para a descoberta de efeitos inseticidas de espécies vegetais antes exploradas para outros fins, mas que seus subprodutos podem ser aproveitados para o controle de pragas em diversas formas (BRITO; OLIVEIRA; DE BORTOLI, 2006).

Estudos têm demonstrado que a toxicidade de alguns compostos dos óleos voláteis constitui uma proteção contra predadores e infestantes. Por exemplo, o mentol e mentona são inibidores do crescimento de vários tipos de larvas. Também existem evidências que alguns insetos utilizam partes desses óleos sequestrados para exercer ação protetora contra predadores. Assim, os vapores de certas substâncias como citronelal e α -pineno podem causar certa irritação suficiente em um predador para fazê-lo desistir de sua presa (SIMÕES et al., 2010).

Problemas de poluição do meio ambiente e efeitos tóxicos de produtos químicos sintéticos aos organismos não alvos estimularam as pesquisas em torno do potencial de pesticidas de origem vegetal. Os produtos naturais de origem vegetal e seus análogos são uma importante fonte de novos defensivos agrícolas usados no controle de doenças de plantas. Dentre esses produtos, os óleos essenciais, caracterizados como metabólitos secundários de plantas e de baixa toxicidade a mamíferos, são amplamente testados no controle de fitopatógenos (SILVA; BASTOS, 2007).

Em relação aos produtos orgânicos sintéticos (presente nos agrotóxicos) deve-se ter bastante atenção, pois esses não possuem alternativas para o controle de doenças, visto que a maioria dos produtos não pode ser utilizada. Sendo que, seu uso indiscriminado provoca o acúmulo de substâncias nocivas no solo e na água, e levam o surgimento de fitopatógenos resistentes ao composto químico e provocam o desequilíbrio ambiental. Aliado a esses fatos, atualmente com o crescimento da exigência dos consumidores por alimentos livres de agrotóxicos, várias pesquisas estão sendo realizadas voltadas para a busca de produtos fitossanitários naturais. Os óleos essenciais vegetais são considerados fontes para o desenvolvimento desses novos produtos naturais. Entretanto, sabe-se que grande parte da flora brasileira ainda não foi estudada, sendo a descoberta de novos compostos químicos, a partir de plantas, capazes de controlar o desenvolvimento de fitopatógenos, de grande importância (SOUZA JR; SALES; MARTINS, 2009).

Dados da base americana United Nations Commodity Trade Statistics Database (COMTRADE) mostram que o Brasil ocupa a terceira posição no mercado mundial de exportação de óleos essenciais, com aproximadamente US\$ 147 milhões, perdendo apenas para o EUA e França. Os maiores consumidores mundialmente de OE são os EUA com 40% e União Europeia (EU) 30%. O mercado mundial de OE gira em torno de US\$ 15 milhões/ano, com crescimento aproximado de 11% por ano. A extração dos óleos essenciais das plantas, sua separação e a concentração de suas frações ou compostos é de extrema importância industrial. Dessa forma, o método de extração é fundamental e varia de acordo com a localização do óleo essencial na planta e conforme utilização do mesmo (RODRIGUES, 2002; SOUZA et al., 2010).

Frequentemente, torna-se necessário dar tratamento químico cujo objetivo é neutralizar, branquear e retificar os óleos extraídos, utilizando técnicas como a retificação que permite a eliminação de compostos irritante e odores desagradáveis, e a desterpenização, eliminação de hidrocarbonetos terpênicos. A baixa estabilidade das moléculas que constituem os OE torna difícil sua conservação. As possibilidades de degradação são inúmeras e podem ser estimadas através da medição de alguns índices (peróxido, refração e índice de acidez), da determinação de características físico-químicas (viscosidade, miscibilidade com álcool, poder rotativo), além das análises por cromatografia gasosa (CG). As propriedades oxidativas aumentam o grau de degradação dos óleos e diminuem seu valor comercial, além de constituir risco quando destinado ao uso externo, pois podem provocar alergias ou dermatites de contato (SIMÕES et al., 2010).

3.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Define-se metabolismo como sendo um conjunto total de reações químicas (anabólicas, catabólicas ou de biotransformação) que ocorrem continuamente em cada célula, isto é, transformação de compostos orgânicos catalisados por enzimas que direcionam essas reações para produção de energia nas células vivas para manutenção diária (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

O metabolismo primário exerce funções vitais na célula pela síntese de substâncias como lipídeos, proteínas, açúcares e entre outras. Enquanto que, o metabolismo secundário destina-se a elementos não essenciais para o organismo produtor, cuja produção e acúmulo estão restritos a números limitados de organismos (DEWICK, 2008; SIMÕES et al., 2010).

Atualmente sabe-se que o meio ambiente juntamente com influência antrópica, vem causando diversas interferências no ecossistema, e em especial na produção de compostos

químicos de determinados vegetais, fungos e etc. Dessa forma, os vegetais acabam produzindo uma quantidade maior de metabólitos secundários que apresentam várias funções que vão desde a defesa contra herbívoros e microrganismos, proteção contra os raios Ultravioletas (UV), a atração de polinizadores ou dispersores de sementes.

Os metabólitos secundários compõem uma rica e diversa classe de compostos que se destinam a dar propriedades ou atividades funcionais de uma dada planta. Porém, a qualidade da matéria vegetal não garante por si só a eficácia e segurança do produto final, pois a análise fitoquímica rege-se de testes qualitativos para detecção de classes de metabólitos, dessa forma a análise físico-química associada com a farmacológica, garante em parte a eficácia por meio de ensaios pré-clínicos e clínicos dos efeitos preconizados (SIMÕES et al., 2010).

Nesse contexto, análise química dos metabólitos secundários e do material botânico quer seja folhas, frutos, galhos e flores, fornecem informações imprescindíveis para formulação de produtos naturais com alta qualidade farmacognóstica, por exemplo.

3.4 ESTUDO QUÍMICO E ENSAIO BIOLÓGICO

A biossíntese de metabólitos secundários antioxidantes nas plantas é significativamente aumentada quando estes absorvem em 300-400 nm fornecendo, assim, um nível de proteção contra oxidantes prejudiciais (radicais livres). As plantas medicinais oportunamente são utilizadas como antioxidantes na medicina tradicional, onde as propriedades terapêuticas seriam sustentadas, em parte por sua capacidade varredora de radicais livres que podem estar associados em muitas doenças. Os agentes antioxidantes atuam no combate a doenças, ligadas ao envelhecimento precoce das células relativo a processos químicos, enfisema, cirrose e arteriosclerose. Doenças essas causadas devido, a ineficiência da proteção antioxidante (COUTINHO et al., 2009; VERBEL et al., 2010).

A caracterização físico-química do material vegetal e óleo essencial constitui-se uma ferramenta de análise preliminar para produção de um novo fármaco a partir de fatores farmacognósticos, por exemplo, a imediata necessidade de secagem para redução do teor de água para inibir a atividade enzimática e o desenvolvimento de microrganismo, ações essas que contribuem para regular a oferta e a comercialização de plantas.

A análise toxicológica frente *Artemia salina* Leach é um bioensaio preliminar que permite estimar a avaliação da toxicidade do extrato ou óleo essencial, através da concentração letal (CL₅₀) da fração ou componentes ativos frente a um organismo marinho. Teste este essencial para determinar o potencial de atividade biológica do composto ou extrato

(NASCIMENTO et al., 2008). Consideram-se extratos praticamente atóxicos com CL_{50} acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ com potencial para serem utilizados como bioativos.

Na identificação de extratos e óleos essenciais, várias técnicas têm sido utilizadas, tanto para o isolamento e purificação, tais como cromatografia líquida de alta resolução, cromatografia gasosa, cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (RMN). A RMN vem sendo utilizada com a vantagem sobre as demais técnicas espectroscópicas no sentido de não requerer pré-tratamento da amostra, e também, uma análise espectral detalhada de espectro de hidrogênio pode fornecer informações sobre a estrutura e a composição química dos principais constituintes químicos majoritários presentes.

A produção e busca por novos agentes antimicrobianos é fruto do rico e diverso bioma brasileiro, em especial o Amazônico, cujos estudos e pesquisas sobre espécies com potencial antibacteriano ainda estão a caminhar para potencializar o efeito desejado. Pesquisas relacionam a utilização de ensaios biológicos *in vitro* de extratos e óleos essenciais para inibição de crescimentos de fungos e bactérias (MOTA, 2013).

A dengue é uma infecção viral transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti* e caracteriza-se por ser um flavivirus com quatro diferentes antígenicos e distintos sorotipos (DENV1-4). É um problema de saúde crescente que estima causar risco a 2,5 bilhões de pessoas, atingindo principalmente os países do sul e sudeste da Ásia. A propagação da dengue ocorre por combinações de fatores: aumento da urbanização, migração e as viagens internacionais e a dificuldade de controle do vetor. O clima ajuda muito para contribuir a propagação global da dengue (WHITEHORN; FARRAR; 2010).

O desenvolvimento de resistência do vetor da dengue aos inseticidas químicos e sua toxicidade motivam a busca de novos inseticidas naturais. O emprego de produtos naturais nas formulações de novos inseticidas como alternativa para o controle do mosquito e vetores de doenças é motivado, devido à composição dos agentes naturais serem biodegradáveis (COSTA et al., 2005).

3.5 A FAMÍLIA LAMIACEAE E ESPÉCIES DE ESTUDO

As plantas da família Lamiaceae (Labiatae) possuem importância agrícola e são bastante utilizadas na culinária, medicina tradicional, indústria farmacêutica e cosmética. A família distribui-se cosmopolitamente com aproximadamente 300 gêneros e 7.500 espécies. No Brasil há ocorrência de cerca 350 espécies distribuídas em 26 gêneros (KRUPPA; RUSSOMANNO, 2008).

Do ponto de vista químico e econômico a família Lamiaceae possui potencial para extração de óleos essenciais (produzidos por pêlos e tricomas glandulares) e estudos são direcionados para avaliação dos constituintes presentes nos óleos. Com a caracterização e qualificação dos OE busca-se estabelecer relação entre a possível aplicação de um produto de origem natural a problemas que acompanham a humanidade desde tempos antigos, por exemplo, a infestação de lavouras, controle bacteriano, fungicida, repelente e inseticida, desde que sejam testados através de ensaios *in vivo* e *in vitro*, e que tenham comprovação científica (De FAZIO, 2011).

Os compostos fenólicos como o ácido rosmarínico e ácido caféico contribuem principalmente para as propriedades antioxidantes nos membros da família Lamiaceae as quais se fazem presente, por exemplo, em alecrim, sálvia (*Salvia* sp.), orégano (*Origanum* sp.), tomilho (*Thymus* sp.) entre outros (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007).

As espécies que serão estudas nessa pesquisa pertencem à família Lamiaceae (**Quadro 1**) e possuem características aromáticas, condimentares, aromatizantes e repelentes. Na medicina tradicional são bastante utilizadas e encontradas em cultivos em hortas e jardins residenciais.

Quadro 1 – Espécies vegetais pertencentes à família Lamiaceae.

Gêneros	Espécies
<i>Rosmarinus</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i> Linn.
<i>Ocimum</i>	<i>Ocimum gratissimum</i> Lineu
	<i>Ocimum micranthum</i> Willd
	<i>Ocimum basilicum</i> Linn.
<i>Mentha</i>	<i>Mentha piperita</i> Linn.
	<i>Mentha pulegium</i> Linn.
	<i>Mentha spicata</i> Linn.
<i>Pogostemom</i>	<i>Pogostemom heyneanus</i> Benth
<i>Hyptis</i>	<i>Hyptis crenata</i> (Pohl) ex Benth

3.5.1 *Rosmarinus officinalis* Linn.

A *Rosmarinus officinalis* Linn. conhecida popularmente por “alecrim, alecrim de jardim, alecrim angola, alecrim da horta, alecrim de cheiro, roris marino (latim), rosemary (inglês), romero (espanhol), ramarin (frânces), ramerino (italiano) e rosmarin (alemão)” pertence ao gênero *Rosmarinus*. É uma especiaria conhecida desde a antiguidade na medicina

tradicional, onde diversos estudos apontam para sua atividade antioxidante (devido à presença, principalmente, de ácido carnósico, carnosol, diterpenos e o ácido rosmarínico) e antibacteriana (HENTZ; SANTIN, 2007; LORENZI, 2008; MAY et al., 2010; CAVALCANTI; ALMEIDA; PADILHA, 2011).

Originária do sul da Europa e norte da África a espécie *R. officinalis* possui porte subarbastivo lenhoso, ereto e pouco ramificada, com cerca de 1,5 m de altura. Suas folhas aromáticas medem entre 1,5 a 4 cm de comprimento e 1 a 3 mm de espessura. A obtenção dos óleos essenciais é através de suas folhas, sendo que sua aplicação farmacológica *in natura* com outras drogas ricas em óleos voláteis está na preparação de infusões na forma galênica ou na aromatização de medicamentos para uso oral (GENENA et al., 2008; PESHEV et al., 2011).

De acordo com Ribeiro et al. (2012) o óleo essencial de *R. officinalis* é constituído por hidrocarbonetos monoterpênicos, ésteres terpênicos, linalol, verbinol, terpineol, 3-octanona e acetato de isobornila, entre outros. A variabilidade de seus constituintes químicos está associada a fatores sazonais e de manejo, tanto para a extração e armazenamento (BRAIDA; MATTEA; CARDARELLI, 2008; SILVA et al., 2010; HERRERO et al., 2010).

3.5.2 *Ocimum gratissimum* Lineu

O gênero *Ocimum* caracteriza-se por ser ervas anuais ou perenes aromáticas, subarbastos ou arbustos nativos da Ásia tropical e da África. Elas são amplamente cultivadas por suas folhas altamente aromáticas, que são utilizadas medicinalmente ou para dar sabor a saladas, sopas e molhos. Algumas espécies são valorizadas em perfumaria e algumas são ricas fontes de cânfora (LORENZI, 2008).

O gênero *Ocimum* compreende cerca de 160 espécies, localizadas principalmente na África, América do Sul e Ásia. As espécies de *Ocimum* presentes no Brasil podem ser divididas, principalmente, em três grupos: (1) espécies cultivadas introduzidas da Europa, (2) espécies naturalizadas e (3) espécies selvagens. Na Amazônia as espécies mais amplamente cultivadas são o *O. minimum* L., *O. micranthum* Willd. e *O. gratissimum* L. (SACCHETTI et al., 2004; LINO et al., 2005; ROSAS et al., 2005; LORENZI, 2008).

Na medicina tradicional o *Ocimum gratissimum* L. é conhecido popularmente como “alfavacão e alfavacão-cravo”. Possui características gerais de ser subarbasto aromático, ereto, com até 1 m de altura. As folhas com cerca de 4-8 cm, caracterizam-se como ovaladas-lanceoladas, de bordas duplamente dentadas. A espécie é originária da Índia, porém adaptou-

se as condições edafoclimáticas do Brasil. As análises químicas dos óleos essenciais qualificaram em três grupos: eugenol, geraniol e timol (PEREIRA; MAIA, 2007).

3.5.3 *Ocimum micranthum* Willd

A espécie *Ocimum micranthum* Willd é conhecida popularmente como “alfavaca, alfavaca do campo, estoraque, alfavaca de galinha e manjerição”.

Planta aromática, herbácea e anual que pode atingir de 30 a 150 cm de altura. Na medicina tradicional é utilizada como estimulante, carminativa, antiespasmódica, diurética e no tratamento de resfriados, febre, gripe, tosse, insônia e bronquites, nas infecções intestinais, estomacais e otites (ROSAS et al., 2004; VERMA et al., 2013).

A composição química do óleo essencial coletado na região norte do Brasil, em estudos anteriores, mostraram a presença dos principais constituintes majoritários os quais foram eugenol, β -elemeno, β -cariofileno, isoeugenol, linalol, 1,8- cineol (eucaliptol), cimato de metila, α e β -pipeno, limoneno, estragol e timol (RODRIGUES, 2006; PINHO, 2010).

3.5.4 *Ocimum basilicum* Linn.

A espécie *O. basilicum* Linn. conhecida popularmente como “alfavaca, alfavaca-cheirosa, alfavaca da américa, alfavaca de vaqueiro, alfavaca do mato, basílico-grande, basilicão, basílicum-grande, erva-real, folhas largas de cozinheiros, manjerição, manjerição da folha branca, manjerição da folha larga, manjerição de molho, quioiô”. Bastante cultivada em quase todo o Brasil em hortas domésticas para uso medicinal e condimentar, sendo comercializadas na forma fresca em feiras e supermercado (SILVA et al., 2003).

Considerada um subarbusto aromático, anual, ereto, ramificado, medindo cerca de 30-50 cm de altura, nativo da Ásia tropical e introduzido no Brasil pela colônia italiana. Apresenta folhas simples, membranáceas, com margens onduladas e nervuras salientes, de 4-7 cm de comprimento. Na medicina tradicional é utilizada como restaurativa, que alivia espasmos, baixa a febre e melhora a digestão, além de eficaz ao combate de infecções bacterianas e parasitas intestinais (LORENZI, 2008; SILVA et al., 2010).

No trabalho de Zabaras e Wyllie (2001) sobre o óleo essencial de *O. basilicum* var. *minima* foram encontrado os constituintes majoritários das folhas, compostos por eugenol, linalol e metil-chavicol, e de acordo com Lorenzi (2008) no extrato foi detectado a presença de taninos, saponinas, flavonoides e cânfora.

3.5.5 *Mentha piperita* Linn.

Conhecida popularmente como “hortelã, hortelã-pimenta, menta, menta-inglesa, hortelã-apimentada, hortelã das cozinhas e sândalo”. O gênero *Menta* inclui de 25-30 espécies e são conhecidos principalmente pelo sabor característico e refrescante. É originária da Europa e foi trazida pelos colonizadores ao Brasil, cultivada como planta medicinal em canteiros de jardim e quintais (HABER et al., 2005; MOREIRA et al., 2007).

Considerada uma erva aromática, anual e perene de com cerca de 30 cm de altura, semiereta, com ramos de cor verde escura e roxo-purpúrea. De acordo com Lorenzi (2008) o levantamento etnobotânico de Silva (2002) registra suas atividades espasmolíticas, antivomitivas, carminativas, estomáquicas e anti-helmínticas, e em uso tópico antibacteriana, antifúngico e antiprurido. Em análise fitoquímica preliminar do óleo essencial, observou-se a presença dos principais constituintes majoritários mentol, mentona e mentofurano, compostos estes que são responsáveis pelo odor agradável (ZAGO et al., 2009; PEGORARO et al., 2010).

3.5.6 *Mentha pulegium* Linn.

A espécie *M. pulegium* Linn conhecida popularmente como “poejo, poejinho, poejo do rei, erva de são lorenço, hortelã-miúda, menta-miúda, menta-selvagem e viqui”. Originária na Europa, Ásia e Península Arábica, adapta-se ao clima temperado (LORENZI, 2008).

Possui características gerais de erva prostrada, perene, graminóide, com cerca de 10 cm de altura, folhas consideradas aromáticas com margens interiais e limbo pontilhado, de menos de 1 cm. Em análise do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa Benayad et al. (2012) quantificaram os constituintes majoritários sendo pulegona (73,3%) e mentona (8,63%), sendo que os componentes quantificados são responsáveis pelo aroma e ação toxica, respectivamente. Os óleos essências da espécie são considerados como antimicrobianos, inseticidas e repelente para cães e gatos (SHIRAZI; AHMADI; KAMALINEJAD, 2004; HASSANPOURAGHDAM et al., 2011).

3.5.7 *Mentha spicata* Linn.

Conhecida popularmente por “hortelã do Brasil, hortelã japonesa, viqui, menta, hortelã-pimenta e menta-inglesa”. A espécie caracteriza-se pelo forte odor aromático. Em farmácias e confeitarias é comercializada em partes ou óleo essencial para conferir sabor e dor de menta a remédios e balas. Dessa forma, na indústria cosmética serve para causar sensação refrescante de loções, creme dental e creme pós-barba (LORENZI, 2008; BIMAKR et al., 2011; BIMAKR et al., 2012).

A literatura etnofarmacológica atribui ação antidispéptica, antivomitiva, descongestionante nasal e antigripal (VIAN et al., 2008; HASSANI et al., 2010). Na pesquisa de Chauhan et al., (2009) foram verificados a presença dos compostos majoritários do óleo essencial para carvone variando entre 49,62-76,65%, seguido de limoneno com variação entre 9,57-22,31%; 1,8-cineol 1,32-2,62% e *trans*-carveol 0,3-1,52%. Segundo Lorenzi (2008) o estudo fitoquímico do óleo essencial detectou a presença de 70% do *l*-mentol e para o extrato verificou a presença de beta-sitosterol.

3.5.8 *Pogostemon heyneanus* Benth

Conhecida popularmente por “oriza” é originária da Ásia, porém existe ocorrência intensiva de cultivo na Indonésia e Malásia. Na America do Sul é encontrado no Paraguai e Brasil, o óleo essencial possui odor característico, persistente e canforáceo (SOUZA FILHO, 2009).

3.5.9 *Hyptis crenata* (Pohl) ex Benth

Já descrita por Corrêa à espécie *Hyptis crenata* (Pohl) ex Benth é uma planta aromática e medicinal (BRAVIM, 2008) e é conhecida como "salva-do-marajó", "salsa-do-campo" ou "hortelã-do-campo" e utilizada pelas comunidades ribeirinhas como especiarias para aromatização de alimentos e na medicina como antiinflamatória (MAIA et al., 2001; ANDRADE et al., 2002 *apud* REBELO et al., 2009).

O chá de suas folhas é usado popularmente como sudorífico, tônico, estimulante, para tratar inflamação dos olhos e garganta, constipação e artrite (BERG, 1993 *apud* BRAVIM, 2008). Além do chá, suas folhas são utilizadas como repelente de insetos quando friccionadas sobre a pele (POTT, 1997 *apud* BRAVIM, 2008). O néctar de suas flores é utilizado para a produção de mel (BERTOLDI et al., 2004 *apud* BRAVIM, 2008). Os óleos essenciais e extratos têm sido estudados quanto à sua potencial utilização como suplemento dietético alternativo para a prevenção de doenças infecciosas e na preservação de alimentos a partir dos efeitos tóxicos de agentes oxidantes (REBELO, 2009). Estudos sobre a composição química de seu óleo essencial demonstraram a riqueza de monoterpenos e sesquiterpenos (SCRAMIN et al., 2000; ZOGHBI et al., 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DAS ESPÉCIES

As espécies foram coletadas na cidade de Macapá-Ap e posteriormente enviada ao Herbário do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá- IEPA para os procedimentos de identificação taxonômica e de elaboração de exsicata.

4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

As folhas foram tratadas (lavadas e secas) para extração dos óleos essenciais. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação (temperatura 100 °C) em aparelho tipo Clevenger durante 3 h (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

4.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A análise do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (CG-EM), utilizando-se equipamento da marca Shimadzu, modelo CGEM-QP 2010 Plus. Empregada uma coluna DB-5HT, da marca J & W Scientific, com 30 m de comprimento, diâmetro de 0,32 mm, espessura do filme de 0,10 µm, e nitrogênio como gás carreador. As condições de operação do cromatógrafo a gás foram: pressão interna da coluna de 56,7 kPa, razão de split de 1:20, fluxo de gás na coluna de 1,0 mL/min. (210 °C), temperatura no injetor de 220 °C, temperatura no detector ou na interface (CG-EM) de 240 °C. A temperatura inicial da coluna será de 60 °C, seguido de um incremento de 3 °C/min. até atingir 240 °C, sendo mantida constante por 30 min. O espectrômetro de massas foi programado para realizar leituras em uma faixa de 29 a 400 Da, em intervalos de 0,5 s, com energia de ionização de 70 eV. Foi injetado 1µL de cada amostra com concentração de 10.000 ppm dissolvido em hexano. A identificação dos constituintes foi baseada na comparação dos índice de Kovats (IK) e espectros de massa de cada substância com os dados da literatura. A fórmula usada para calcular o IK foi a seguinte:

$$IK = 100 \times NCHmn + 100 \times \left(\frac{TRO - TRHmn}{TRHmr - TRHmn} \right), \text{ onde:}$$

IK= Índice de Kovats ou índice de retenção de Kovats;

NCHmn= N° de carbono na molécula do hidrocarboneto imediatamente menor;

TRO= Tempo de retenção do componente do óleo essencial;

TRHmn= Tempo de retenção do hidrocarboneto imediatamente menor;

TRHmr= Tempo de retenção do hidrocarboneto imediatamente maior.

4.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A avaliação da atividade antioxidante foi baseada na metodologia proposta por Sousa et al. (2007), Lopes-Lutz et al. (2008) e Andrade et al. (2012) diante do consumo de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) com algumas modificações.

Foi preparada uma solução metanólica de DPPH na concentração de 40 µg.mL⁻¹. Os óleos essenciais foram diluídos em metanol nas concentrações (5; 1; 0,75, 0,50; e 0,25 mg.mL⁻¹). Para a avaliação, foram adicionados em um tubo de ensaio 2,7 mL da solução estoque de DPPH, seguido da adição de 0,3 mL da solução de óleo essencial. Paralelamente, foi preparado o branco, sendo este uma mistura de 2,7 mL de metanol e a solução metanólica dos compostos avaliados. Após 30 minutos foram realizadas leituras em espectrofotômetro (Biospectro SP-22) no comprimento de onda de 517 nm (TEPE et al., 2005). A atividade antioxidante foi calculada de acordo com Sousa et al. (2007).

$$(\%AA) = 100 - \{[(Abs_{amostra} - Abs_{branco})100]/Abs_{controle}\}$$

%AA – porcentagem de atividade antioxidante

Abs_{amostra} – Absorbância da amostra

Abs_{branco} – Absorbância do branco

Abs_{controle} – Absorbância do controle

4.5 TESTE DE TOXICIDADE

O ensaio de citotoxicidade frente a *A. salina* Leach foi baseado na técnica de Araujo et al. (2010) e Lôbo et al. (2010). Inicialmente, foram preparados 250 mL da solução sal marinho sintético (35,5 g/L) para incubação de 25 mg de ovos de *A. salina*, no qual foram expostas a luz artificial em período de 24 h para eclosão das lavas (metanáuplios), em seguida os metanáuplios foram separados e colocados em ambiente escuro por período de 24 h para alcançarem estágio de náuplios. A solução mãe foi preparada contendo 62,5 mg do óleo essencial, adicionados 28 mL da solução de sal marinho sintético e 2 mL de dimetilsufóxido (DMSO) para facilitar a solubilização do mesmo.

Posteriormente, ao término do período em escuro os mesmos foram selecionados e divididos em 7 grupos com 10 indivíduos em cada tubo de ensaio, em cada grupo foi adicionada uma alíquota da solução mãe (3125, 2500, 1250, 625, 250, 25 e 2,5 µL) e completado o volume para 5 mL com solução de sal marinho sintético, obtendo-se soluções finais com as seguintes concentrações de 1250, 1000, 500, 250, 100, 10 e 1 µg/mL, dessa forma os grupos foram designados de acordo com sua respectiva concentração e todos os

testes foram realizados em triplicatas. Ao final foram contabilizadas o número de não sobreviventes para determinação de CL_{50} por meio da análise PROBIT do software SPSS®.

4.6 ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA

Para a atividade microbiológica dos óleos essenciais, foi utilizado 2 linhagens de bactérias, uma gram-positiva (*Staphylococcus aureus* – ATCC 25923) e uma gram-negativa (*Escherichia coli* – ATCC 25922), sendo realizado obedecendo-se as normas e procedimentos do Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2009). O teste para avaliação da atividade antibacteriana foi realizado em triplicata.

4.6.1 Meios de cultura

O meio Agar Mueller-Hinton (MH) foi utilizado para os ensaios de atividade antimicrobiana e o preparado conforme instruções do fabricante, seguindo a distribuição de 25 mL por placa de Petri de 90 x 15 mm.

4.6.2 Suspensão bacteriana e inóculo

A partir do crescimento em Agar Mueller-Hinton, após incubação por 24 horas a 37 °C, repicou-se de 2 a 4 colônias em 1 mL de solução salina 0,85% estéril, até obter uma turvação semelhante a da escala 0,5 de MacFarland para obter uma concentração final de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

4.6.3 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, foi empregado o método de disco difusão em ágar. Cada suspensão de micro-organismo foi semeada (em triplicata), com auxílio de um *swab* descartável estéril, em toda a superfície de meio ágar Muller Hinton. Foi preparada uma solução com concentração de 250 mg/mL solubilizado com Tween 80 e em seguida foi realizadas diluições até obter-se as concentrações 100, 50 e 10 mg/mL, foram impregnadas em discos de papel-filtro (Whatman – tipo 3), de 6 mm de diâmetro 10 µL de cada concentrações, respectivamente. Após incubação das placas a 35 °C por 24h foi realizada a leitura dos resultados medindo-se o halo formado ao redor dos discos contendo o óleo. Foi considerado, como resultado final de cada diluição, a média das três medidas e, como suscetível halo, uma dimensão igual ou superior a 8 mm de diâmetro (GARCIA, UEDA, MIMICA; 2011; MENDES et al, 2011).

O experimento de disco-difusão foi controlado utilizando-se discos impregnados com os antibióticos de referência: Cifoxitina, oxacilina e gentamicina para verificar a sensibilidade do microrganismo testado e para controle negativo foram impregnados discos contendo água e Tween 80.

4.7 ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL

4.7.1 Larvas

As larvas de *A. aegypti* utilizadas nos bioensaios foram provenientes da colônia mantida no insetário do Laboratório de Arthropoda da Universidade Federal do Amapá, todas da geração F₆, do 3º estágio jovem.

4.7.2 Bioensaios

Os ensaios biológicos foram conduzidos em uma sala (3m x 4m) com condições climáticas controladas: temperatura de 25±2°C, umidade relativa do ar de 75±5%, fotoperíodo de 12 horas, localizada no Laboratório de Arthropoda da Universidade Federal do Amapá, Macapá.

A metodologia utilizada seguiu o protocolo padrão da WHO (1984; 1986a; 1986b) com modificação no recipiente teste. Após a análise de séries de ensaios preliminares foram selecionadas as concentrações: 500, 400, 300, 200 e 130 ppm .

Uma solução-mãe foi preparada com óleo essencial, e pré-solubilizado em Tween 80 e dissolvida em 93 mL de água para obter a concentração de 1500 ppm. A partir desta solução, uma série de diluições foi preparada para obter soluções de concentrações de 500, 400, 300, 200 e 130 ppm. Para cada repetição de um tratamento foram utilizadas 10 larvas, pipetadas para um béquer de 100 mL contendo água destilada. Em seguida, as larvas foram removidas do béquer para o recipiente-teste, assim minimizando-se o tempo entre o preparo da primeira e última amostra. Foi verificada a inocuidade do solvente na concentração empregada, estando à mesma presente, também nas réplicas do controle. Durante o experimento, a temperatura média da água foi de 25 °C. Após 24 e 48 horas foram contadas as larvas mortas, sendo consideradas como tais todas aquelas incapazes de alcançar a superfície. Os dados obtidos da mortalidade (%) x concentração (ppm) foram analisados pelo programa SPSS, em gráfico de Probit, para determinar a Concentração Letal que causa mortalidade de 50% da população (CL₅₀).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

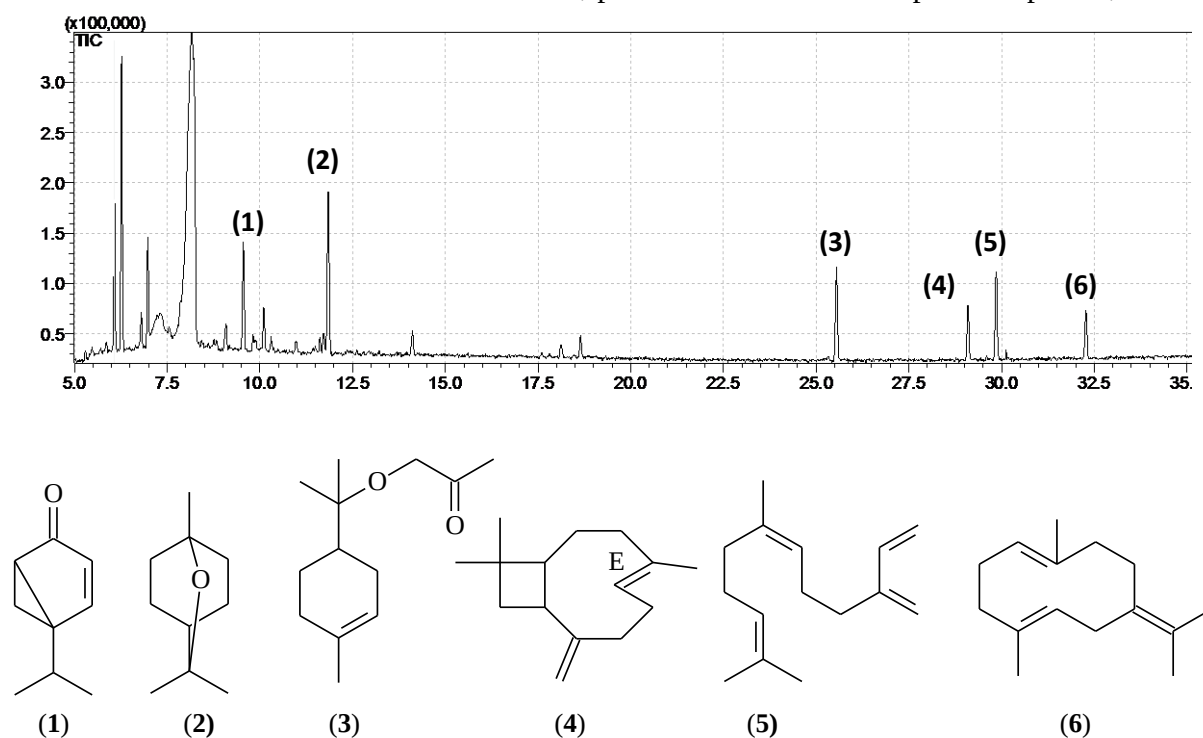
A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA). As diferenças significativas entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS POR CG-EM

Em análise por CG-EM do óleo essencial de *R. officinalis* foram encontrados 6 compostos e identificados, o Sabineno (1), 1,8-Cineol (2), Acetato de α -terpineol (3), Cariofileno (4), (Z) Beta-Farneseno (5) e B-Germacreno (6) representando (54,1%) do óleo essencial. O componente químico majoritário encontrado foi o 1,8-Cineol (2) (45,7%). Os picos dos compostos podem ser observados no cromatograma e suas respectivas fórmulas estruturais, conforme **Figura 1**.

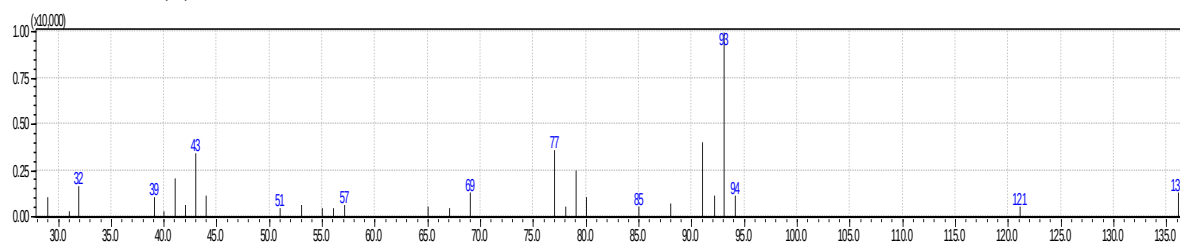
Figura 1- Cromatograma obtido por CG do óleo essencial de *R. officinalis*. Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 60 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 3 °C/min. até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 30,0 min.



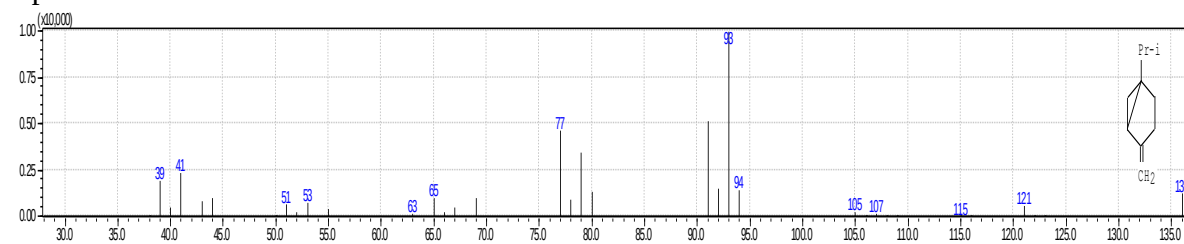
O espectro de massas foi comparado com espectro de massas na biblioteca do equipamento Wily/PBM do sistema CG-EM. Esta comparação e identificação do constituinte presente no OE de *R. officinalis* encontram-se na **Figura 2**, e o seus respectivos tempos de retenções e porcentagens constam na **Tabela 1**.

Figura 2 - Espectros de massas do óleo essencial obtidos por CG-EM em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento.

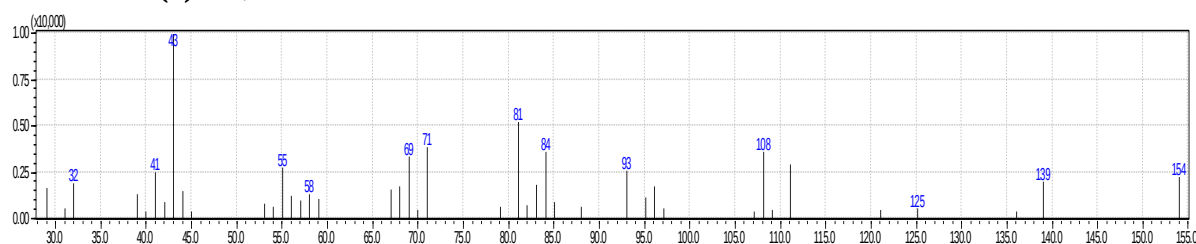
Substância (1) – Sabineno



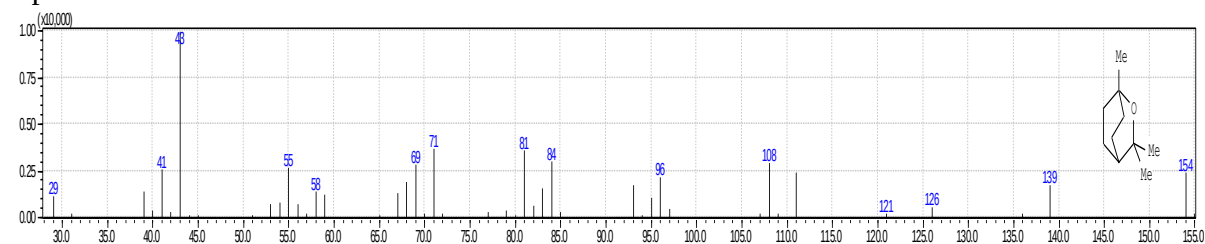
Espectro de massas da biblioteca



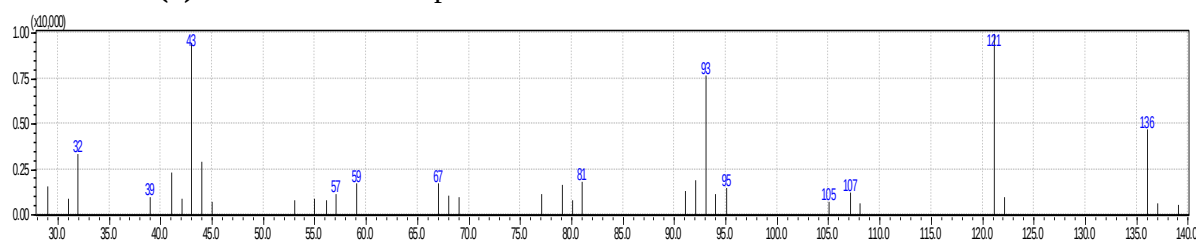
Substância (2) – 1,8-Cineol



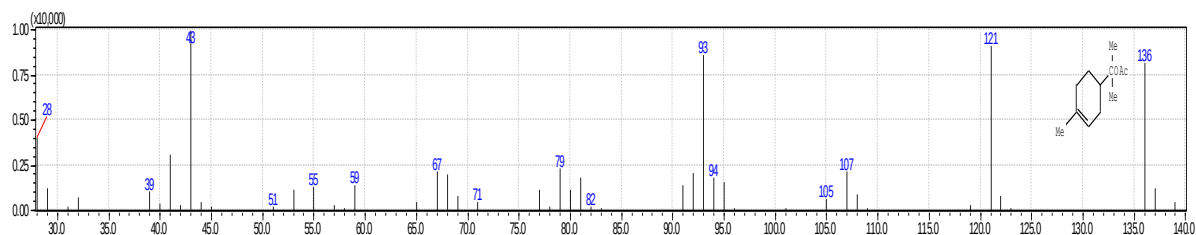
Espectro de massas da biblioteca



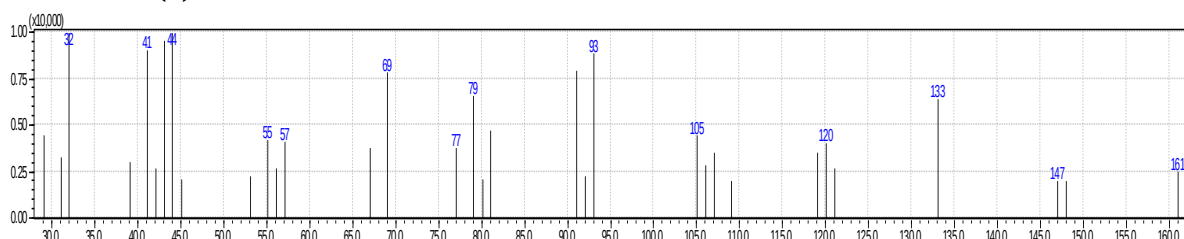
Substância (3) – Acetato de α -terpineol



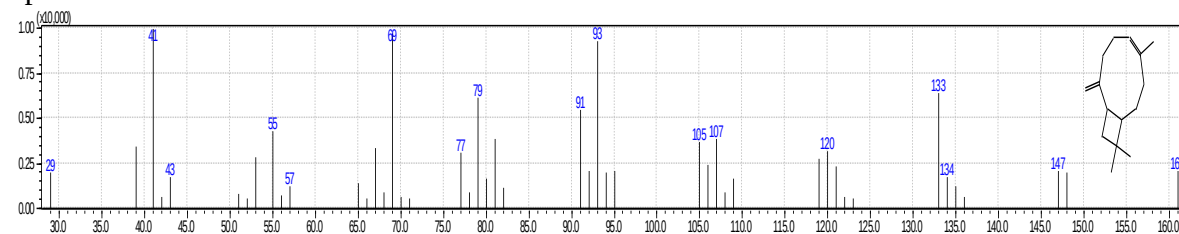
Espectro de massas da biblioteca



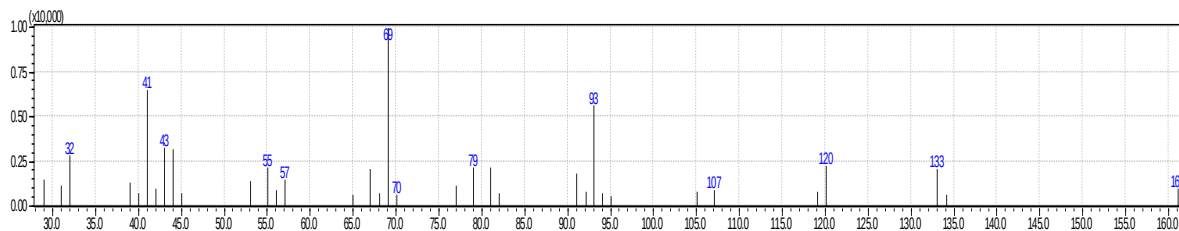
Substância (4) – Cariofileno



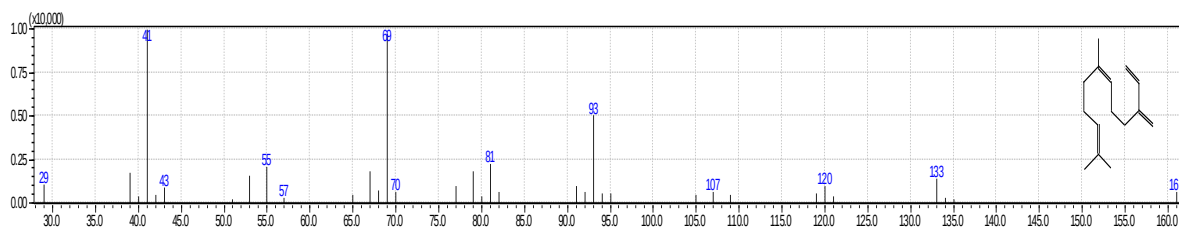
Espectro de massas da biblioteca



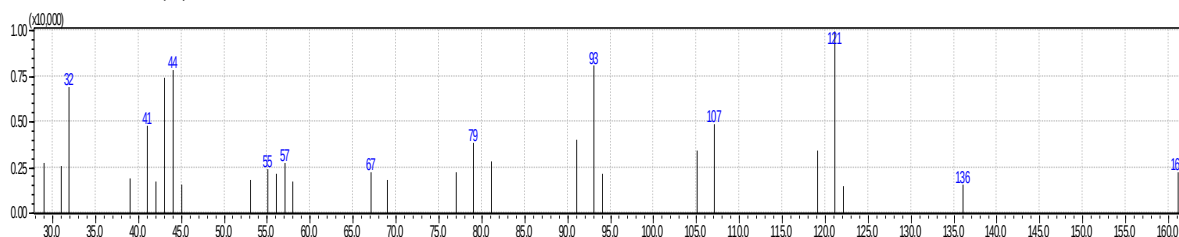
Substância (5) – (Z) Beta-Farneseno



Espectro de massas da biblioteca



Substância (6) – B-Germacreno



Espectro de massas da biblioteca

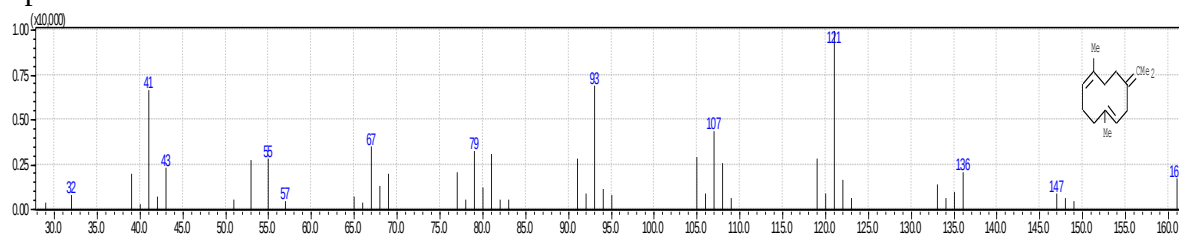


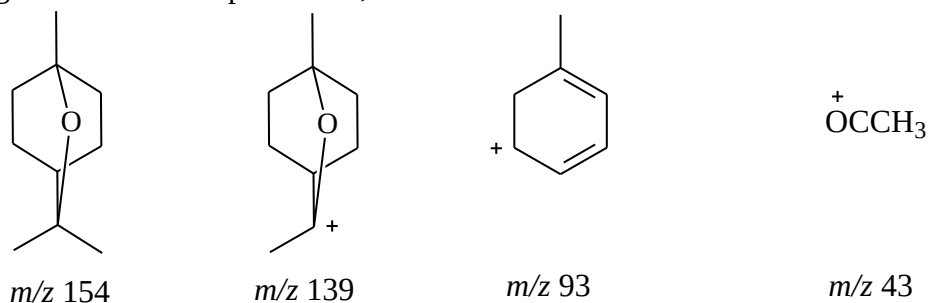
Tabela 2- Compostos identificados pelo IK do OE de *R. officinalis*. Os tR (min.) foram obtidos por CG-EM.

Composto	tR	Porcentagem relativa (%)	IK*	IK
Sabineno	9.56	1.5	975	977
1,8-Cineol	11.84	45.7	1031	1072
Acetato de α -terpineol	25.55	9	1349	1329
Cariofileno	29.10	12.4	1419	1426
(Z) Beta-Farneseno	29.86	17.8	1442	1432
B-Germacreno	32.27	13.4	1561	1462
Total		99.8		

t_R= tempo de retenção; IK* =Índice de Kovats (ADAMS, 2012);IK= Índice de Kovats calculado.

Na inspeção do espectro de massa da **Substância (2)** e identificação do pico do íon molecular, pode-se afirmar com relação na m/z que a massa molecular do composto identificado é de 154,25 g/mol, que por correlação corresponde à massa molecular do composto 1,8-Cineol. Analisado o perfil de fragmentação do composto e comparando-os com a biblioteca do equipamento, equipara-se ao 1,8-Cineol representado pelos fragmentos iônicos típicos, conforme a **Figura 3**.

Figura 3- Fragmentos iônicos típicos do 1,8-Cineol.

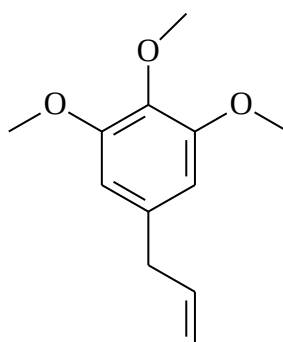
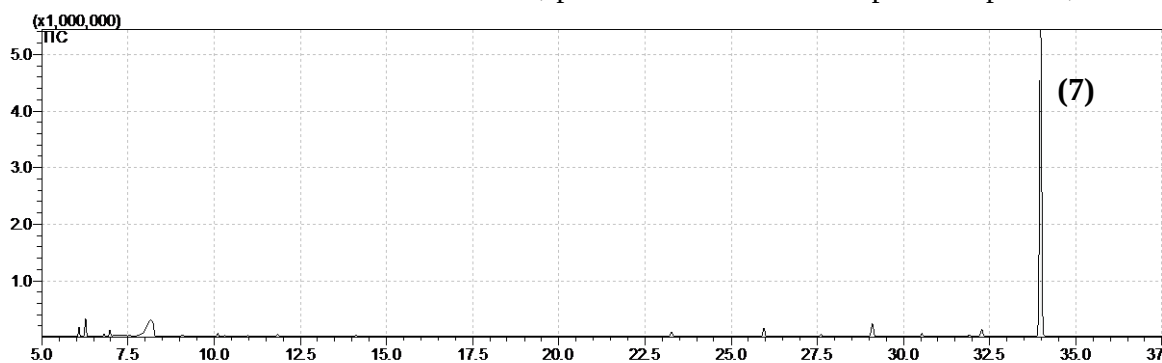


O fragmento de massas m/z 154[M^+] corresponde ao íon molecular, enquanto que o fragmento m/z 139 [$M^+ - 15$] corresponde à perda da metila ($-CH_3$), a m/z 43 que é o pico íon base, fragmente este muito estável, característico de estabilidade por ressonância.

Em análise por CG-EM do óleo essencial de *O. migranthurum* foi encontrado 1 composto e identificado, representando (53%) do óleo. O componente químico majoritário

encontrado foi a Elemecina (7). O pico do composto pode ser observado no cromatograma e suas respectivas fórmulas estruturais, conforme **Figura 4**.

Figura 4- Cromatograma obtido por CG do óleo essencial de *O. migranthurum*. Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 60 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 3 °C/min. até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 30,0 min.

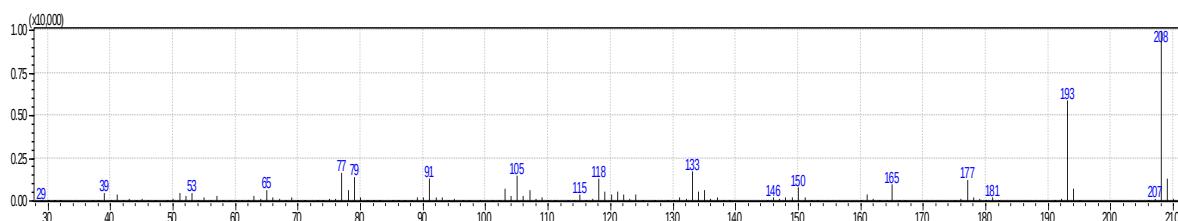


Substância (7)

O espectro de massa foi comparado com espectro de massas na biblioteca do equipamento Wily/PBM do sistema CG-EM. Esta comparação e identificação do constituinte presente no OE de *O. migranthurum* encontram-se na **Figura 5**, e os seu respectivo tempo de retenção e porcentagem constam na **Tabela 2**.

Figura 5 - Espectros de massas do óleo essencial obtidos por CG-EM em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento.

Substância (7) – Elemencina



Espectro de massas da biblioteca

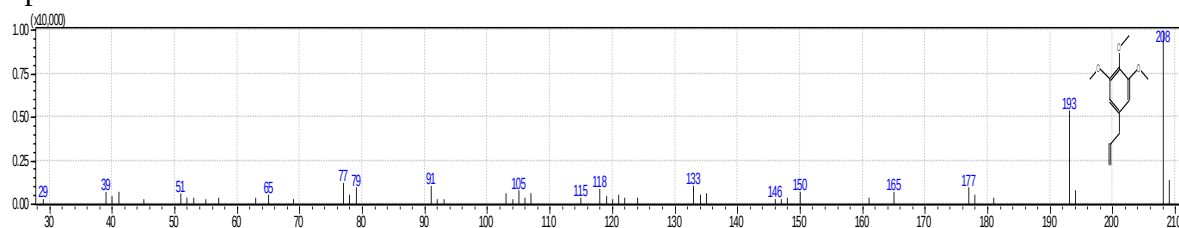


Tabela 2- Compostos identificados como monoterpênos do OE de *O. migranthurum*. Os tR (min.) foram obtidos por CG-EM.

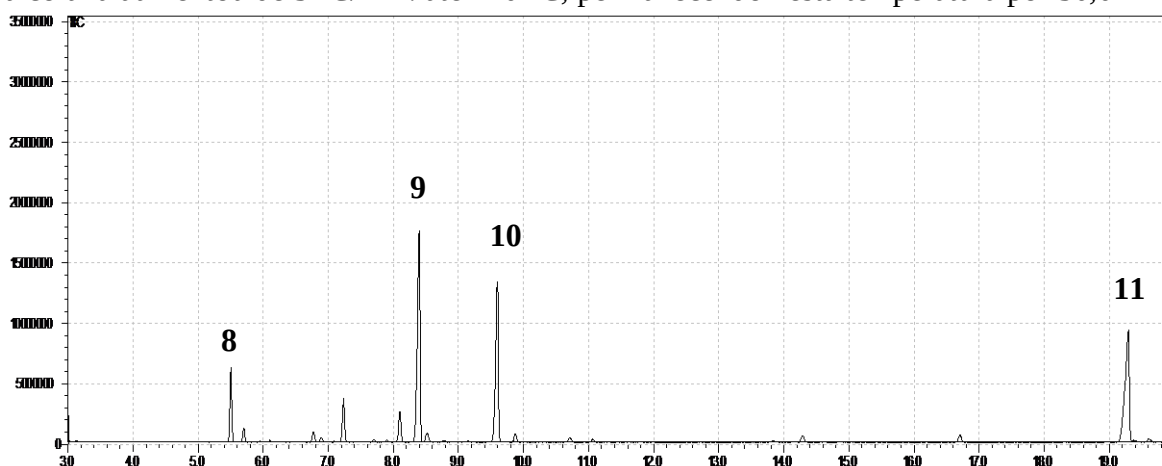
Composto	tR	Porcentagem relativa (%)	IK*	IK
Elemencina	33,95	53	1557	1467
Total		53		

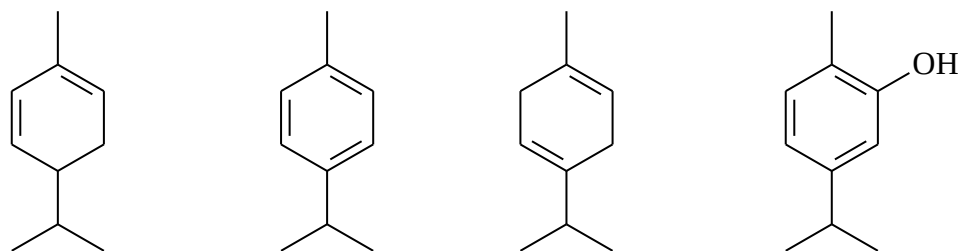
tR= tempo de retenção; IK*=Índice de Kovats (ADAMS, 2012);IK= Índice de Kovats calculado.

O perfil de fragmentação da **Substância (7)** do óleo essencial, característico de composto aromático, o pico m/z 193 [M-15] é típica perda de grupo metila.

Em análise por CG-EM do óleo essencial de *O. gratissimum* foram encontrados 9 compostos e identificados, representado (95,26%) do óleo, sendo estes caracterizados como monoterpênos. Os componentes químicos majoritários encontrados foram: α -felandreno (**8**), *p*-cinemo (**9**), γ -terpineno (**10**) e carvacrol (**11**). Os picos dos compostos podem ser observados no cromatograma e suas respectivas fórmulas estruturais, conforme **Figura 6**.

Figura 6- Cromatograma obtido por CG do óleo essencial de *O. gratissimum*. Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 60 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 3 °C/min. até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 30,0 min.



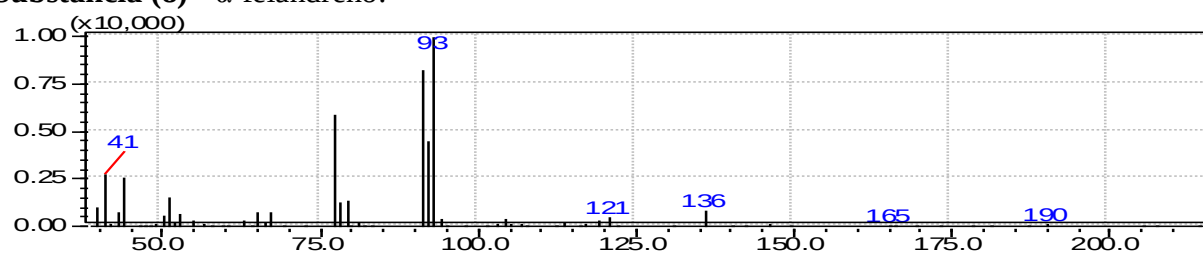


Substância (8) **Substância (9)** **Substância (10)** **Substância (11)**

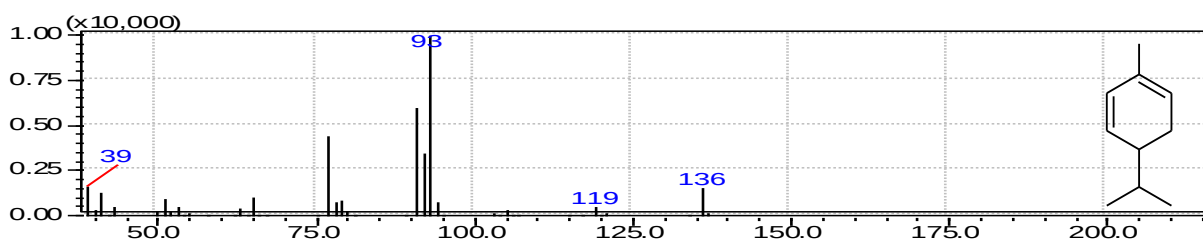
Os espectros de massas foram comparados com espectros de massas de monoterpenos encontrados na biblioteca do equipamento Wily/PBM do sistema CG-EM. Esta comparação e identificação dos constituintes presentes no OE de *O. gratissimum* encontram-se na **Figura 7**, e os seus respectivos tempos de retenção e porcentagens constam na **Tabela 3**.

Figura 7 - Espectros de massas do óleo essencial obtidos por CG-EM em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento.

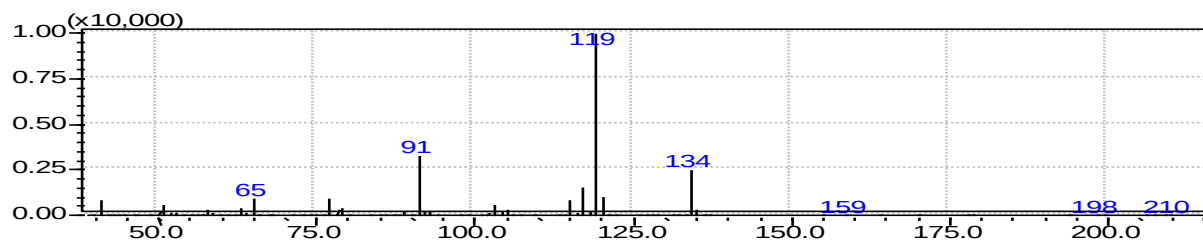
Substância (8) - α-felandreno.



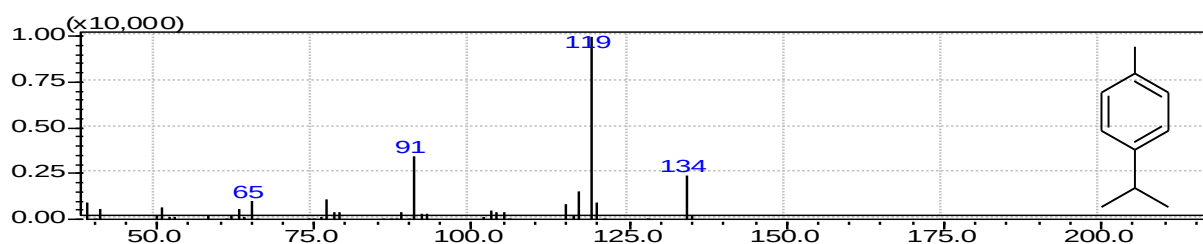
Espectro de massas da biblioteca



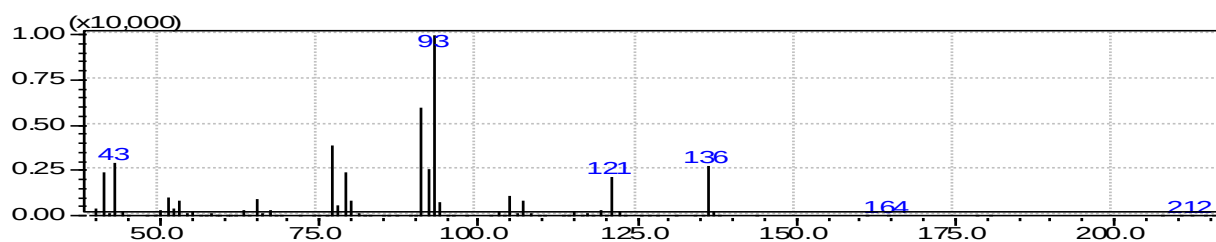
Substância (9) – p-cinemo.



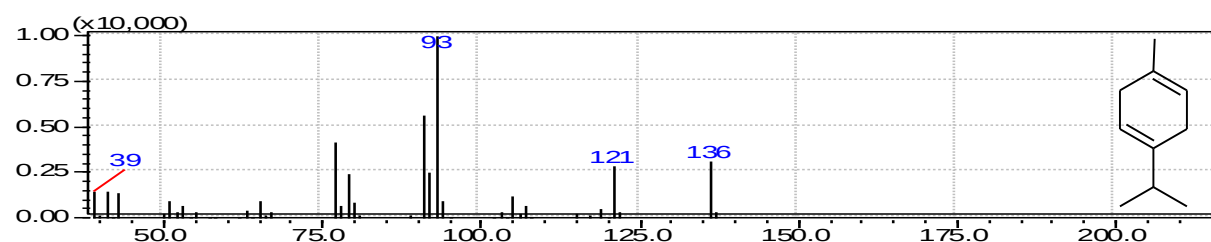
Espectro de massas da biblioteca



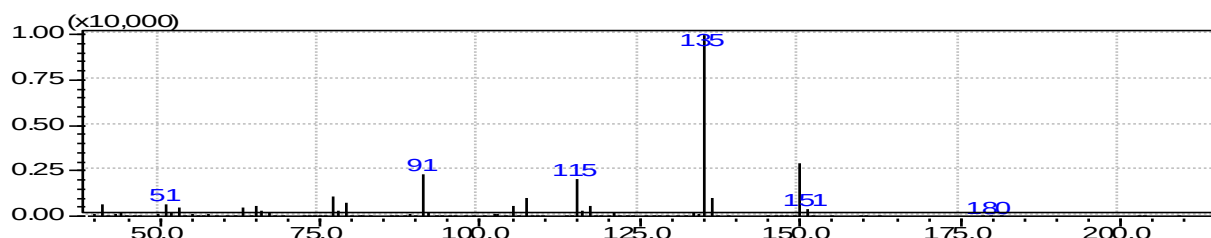
Substância (10) – γ -terpineno.



Espectro de massas da biblioteca



Substância (11) – Carvacrol.



Espectro de massas da biblioteca

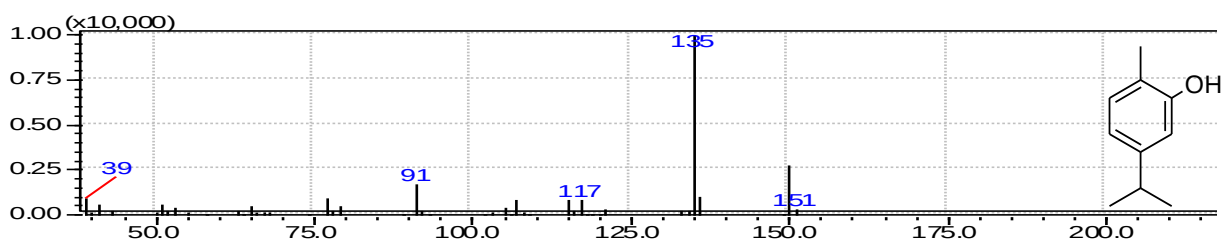


Tabela 3 - Compostos identificados como monoterpenos do OE de *O. gratissimum*. Os tR (min.) foram obtidos por CG-EM.

Nome	tR	Porcentagem relativa (%)	IK*	IK
α -felandreno	5,500	3.2	1024	1054
β -ocimeno	5,700	2.4	1032	1010
α -pineno	6,770	0.56	939	931
β -pineno	6,890	4.9	979	933
β -mirceno	7,235	2.8	990	941
α -terpinoleno	8,095	0.6	1088	1035
<i>p</i> -cinemo	8,395	16.6	1024	1054
γ -terpineno	9,600	25.6	1059	1100

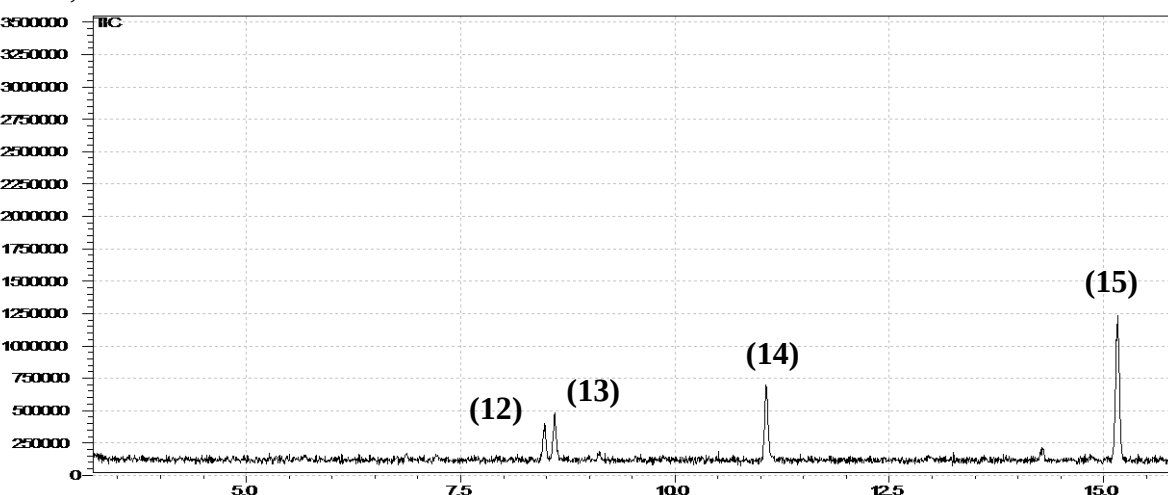
Carvacrol	19,295	38.6	1290	1307
Total		95.26		

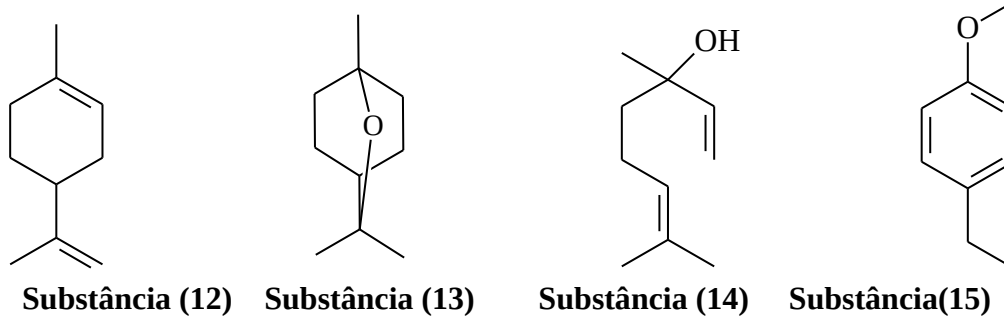
t_r = tempo de retenção; IK^* =Índice de Kovats (ADAMS, 2012); IK = Índice de Kovats calculado.

O perfil de fragmentação da **Substância (11)** corresponde ao composto majoritário do óleo essencial analisado, o Carvacrol. Os fenóis são compostos aromáticos que exibem picos íons molecular intensos. O pico do íon base em $m/z = 150$ $[M-15]$, para o carvacrol, corresponde a perda de um grupo metila. A presença do pico em $m/z = 91$ é característica de compostos aromáticos e indica a formação do íon tropílio ($C_7H_7^+$) fragmento estável que apresenta ressonância. O pico $m/z=77$ corresponde ao íon $C_6H_5^+$, também típico de aromático, resultado da eliminação de grupo metileno do íon tripílio, e o íon $C_6H_5^+$ por sua vez elimina o $HC\equiv CH$ para originar o íon m/z 51 (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012; LISTON 2013).

Em análise por CG-EM do óleo essencial de *O. basilicum* foram encontrados 4 compostos e identificados, representado (93%) do óleo, sendo estes caracterizados como monoterpenos. Os componentes químicos encontrados foram: limoneno (12), 1,8-Cineol (13), linalol (14) e metilchavicol (15). Os picos dos compostos podem ser observados no cromatograma e suas respectivas fórmulas estruturais, conforme **Figura 8**.

Figura 8- Cromatograma obtido por CG-EM do óleo essencial de *O. basilicum*. Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 60 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 3 °C/min. até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 30,0 min.

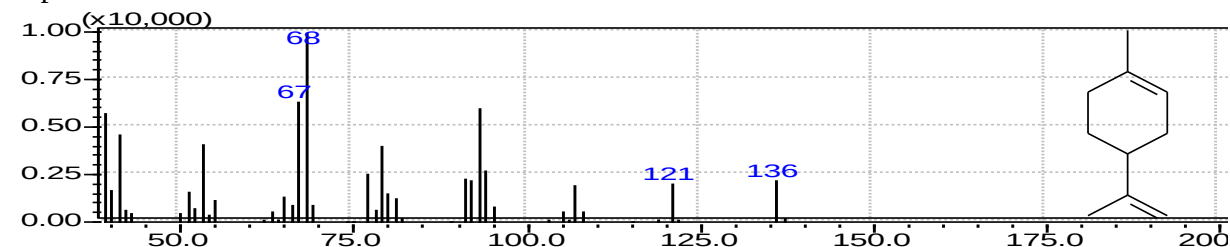
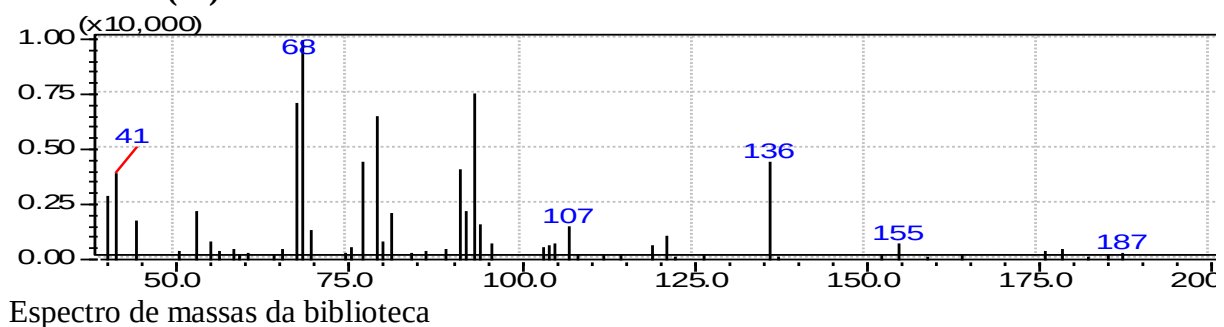




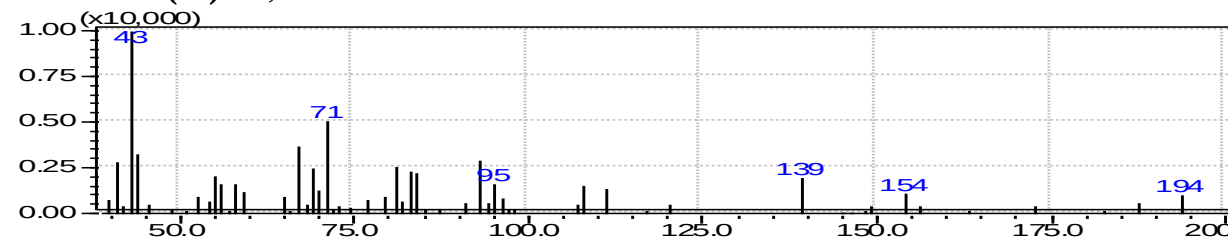
Os espectros de massas foram comparados com espectros de massas de monoterpenos encontrados na biblioteca do equipamento Wily/PBM do sistema CG-EM. Esta comparação e identificação dos constituintes presentes no OE de *O. basilicum* encontram-se na **Figura 9**, e os seus respectivos tempos de retenção e porcentagens constam na **Tabela 4**.

Figura 9 - Espectros de massas do óleo essencial obtidos por CG-EM em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento.

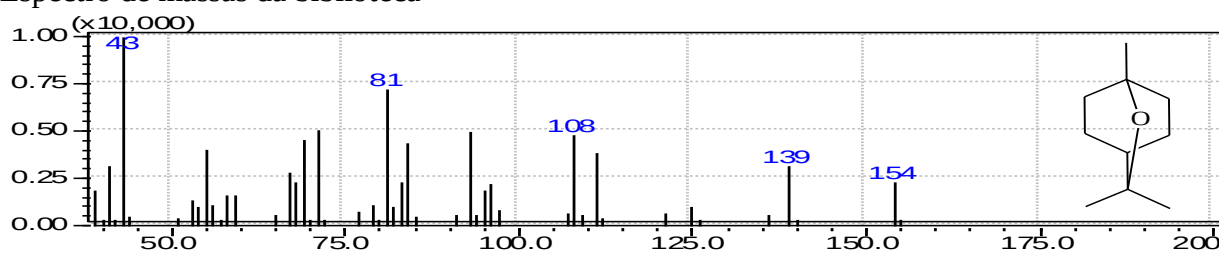
Substância (12) – Limoneno.



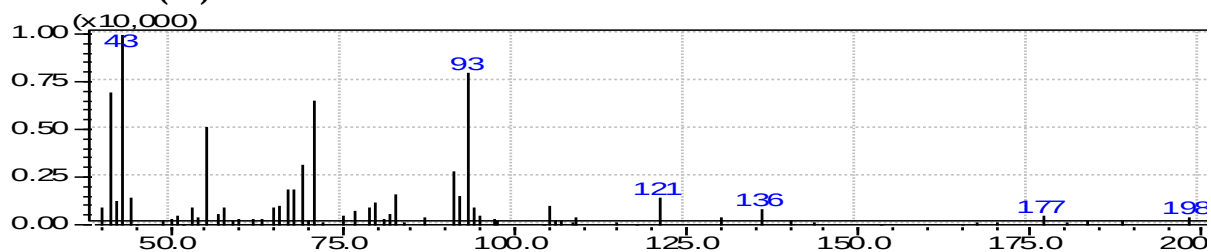
Substância (13) – 1,8-Cineol.



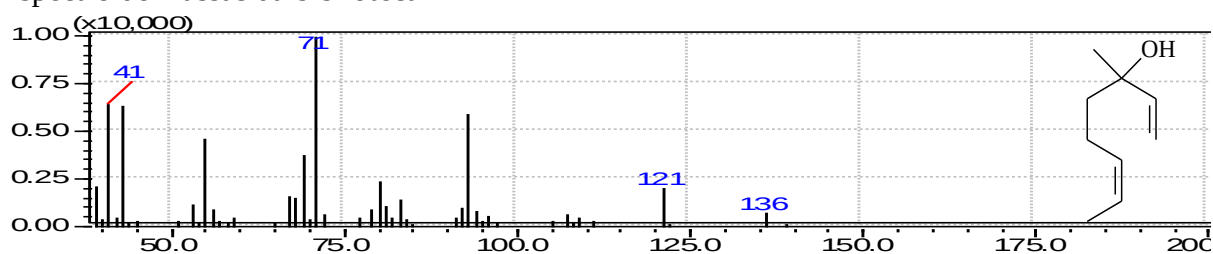
Espectro de massas da biblioteca



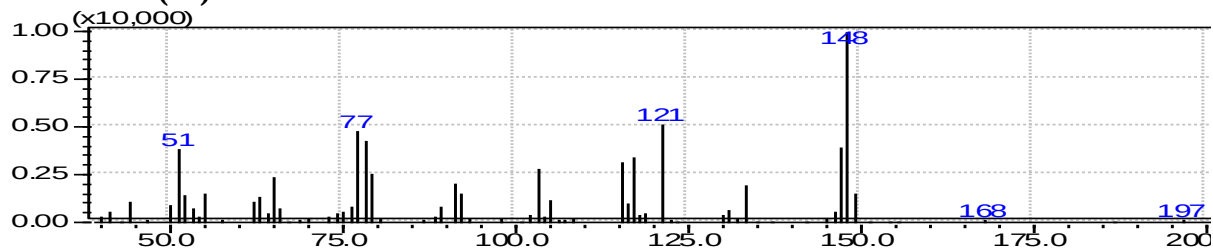
Substância (14) - Linalol.



Espectro de massas da biblioteca



Substância (15) – Metil-Chavicol.



Espectro de massas da biblioteca

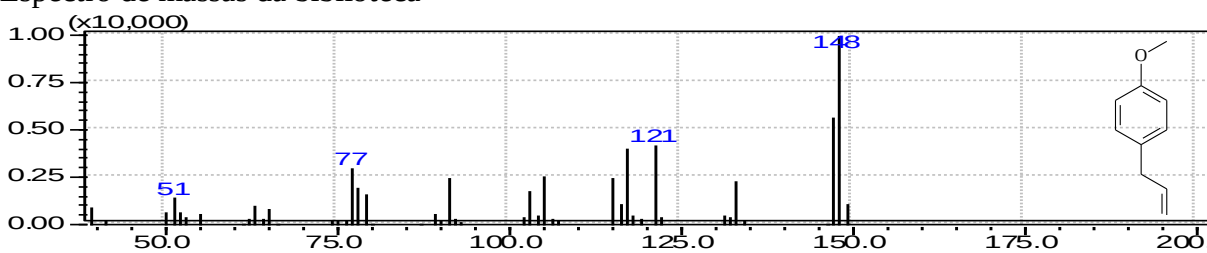


Tabela 4- Compostos identificados como monoterpênos do OE de *O. basilicum*. Os t_R (min.) foram obtidos por CG-EM.

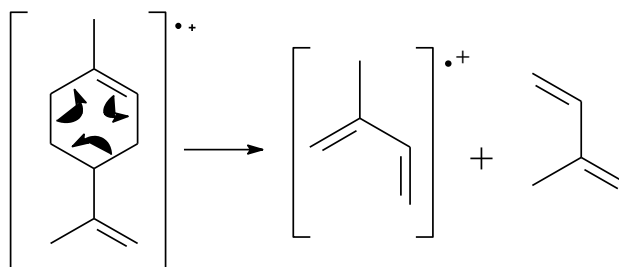
Composto	t _R	Porcentagem relativa (%)	IK*	IK
Limoneno	8.48	13	1029	1034
1,8 Cineol	8.60	15	1031	1043
Linalol	11.06	20	1095	1102
Metilchavicol	15.15	45	1196	1208

Total	93
-------	----

t_R = tempo de retenção; IK^* =Índice de Kovats (ADAMS, 2012); IK = Índice de Kovats calculado.

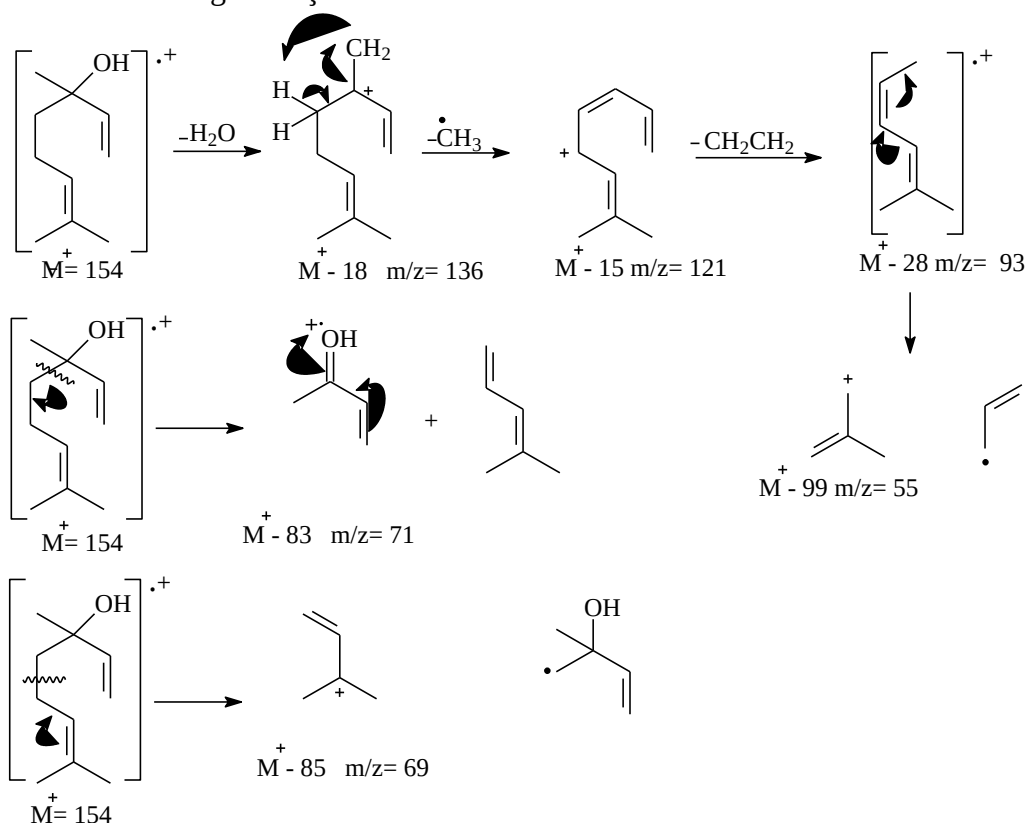
O perfil de fragmentação observado da Substância **(12)** mostra o pico em m/z 121 que é referente à perda do grupo metila, e o pico em m/z 93 pode ser decorrente da estrutura $C_7H_9^+$ que é formada por isomerização, seguida de clivagem alílica. Observa-se também que o fragmento de massa m/z 136 refere-se ao íon molecular, comumente observável em olefinas. O pico do íon base é observado no fragmento de massa m/z 68 que são fragmentos dos produtos da reação de *retro*-Diels-Alder, conforme **Figura 10**.

Figura 10- Fragmentação do limoneno pela reação de *retro*-Diels-Alder.



Os alquenos cíclicos mostram habitualmente um pico do íon molecular distinto. A reação de *retro*-Diels-Alder do limoneno sofre rearranjo, no qual um dos fragmentos isopreno é uma molécula neutra (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012).

Os picos com a relação m/z 136 e 121, foram produzidos pela fragmentação da molécula com perda de água e seguida por perda de radical metil ($\cdot CH_3$). A saída do etano do fragmento com m/z 121 gera o cátion com m/z 93. Observa-se também a quebra alílica no pico em m/z 69, formando um cátion e outro fragmento na forma de radical. O pico do íon base aparece em m/z 71 e é formado através da perda de massa em relação ao íon molecular, conforme **Figura 11**.

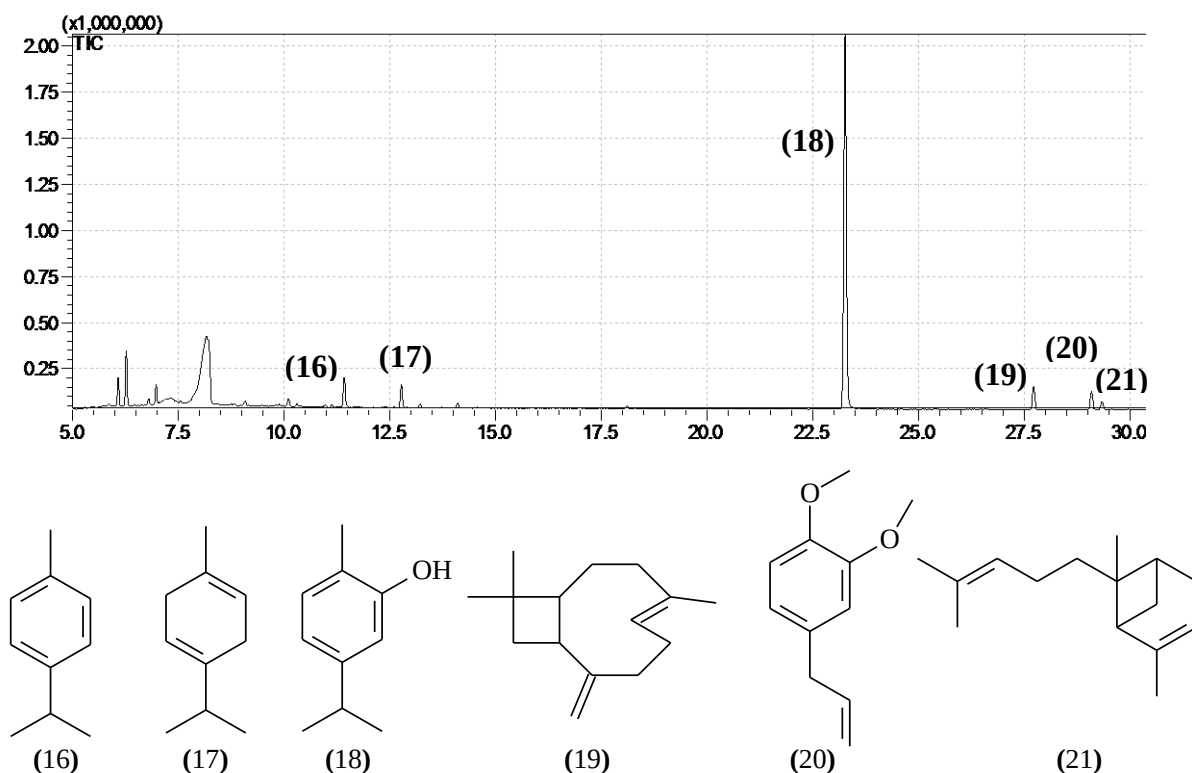
Figura 11- Perfil de fragmentação do Linanol.

A deslocalização da carga positiva entre os carbonos insaturados e o oxigênio, que suporta bem a carga, torna este fragmento o mais estável entre os outros produzidos.

Os principais picos com suas relações massa carga foram m/z 148 que representa o pico do íon base e ao mesmo tempo o íon molecular, que confirma a fórmula do composto $C_{10}H_{12}O$. O pico de massa m/z 133 corresponde à perda de uma metila [$M^+ - 15$], no qual o pico da relação massa carga m/z 117 refere-se ao fragmento $C_9H_9^+$ gerado a partir de um rearranjo do íon molecular com consequente perda de uma molécula neutra (H_2CO) e de um radical $\cdot H$, o pico de massa m/z 105 refere-se ao fragmento $C_8H_9^+$ pela perda de (CO) , enquanto que o pico de m/z 91 corresponde ao tropílio, íon clássico de todo sistema aromático. O fragmento m/z está relacionado com o cátion aromático $C_6H_5^+$ gerado pela perda de uma molécula neutra (H_2CO) e da cadeia lateral do composto aromático.

Em análise por CG-EM do óleo essencial de *M. piperita* foram encontrados 6 compostos e identificados, o *p*-Cimeno (**16**), γ -Terpineno (**17**), Carvacrol (**18**), Metil-eugenol (**19**), Cariofileno (**20**) e Trans- α -bergamoteno (**21**) representando (71,31%) do óleo essencial. Os picos dos compostos podem ser observados no cromatograma e suas respectivas fórmulas estruturais, conforme **Figura 12**.

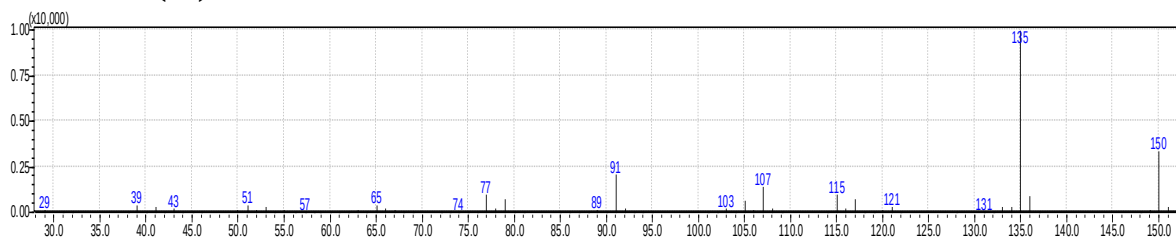
Figura 12- Cromatograma obtido por CG do óleo essencial de *M. piperita*. Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 60 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 3 °C/min. até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 30,0 min.



O espectro de massa foi comparado com espectro de massas na biblioteca do equipamento Wily/PBM do sistema CG-EM. Esta comparação e identificação do constituinte majoritário presente no OE de *M. piperita* encontram-se na **Figura 13**, e o seu respectivo tempo de retenção e porcentagem constam na **Tabela 5**.

Figura 13 - Espectros de massas do composto majoritário do óleo essencial obtidos por CG-EM em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento.

Substância (18) – Carvacrol



Espectro de massas da biblioteca

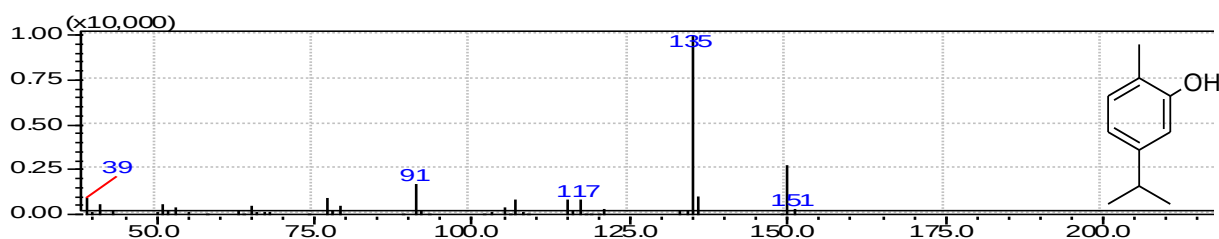


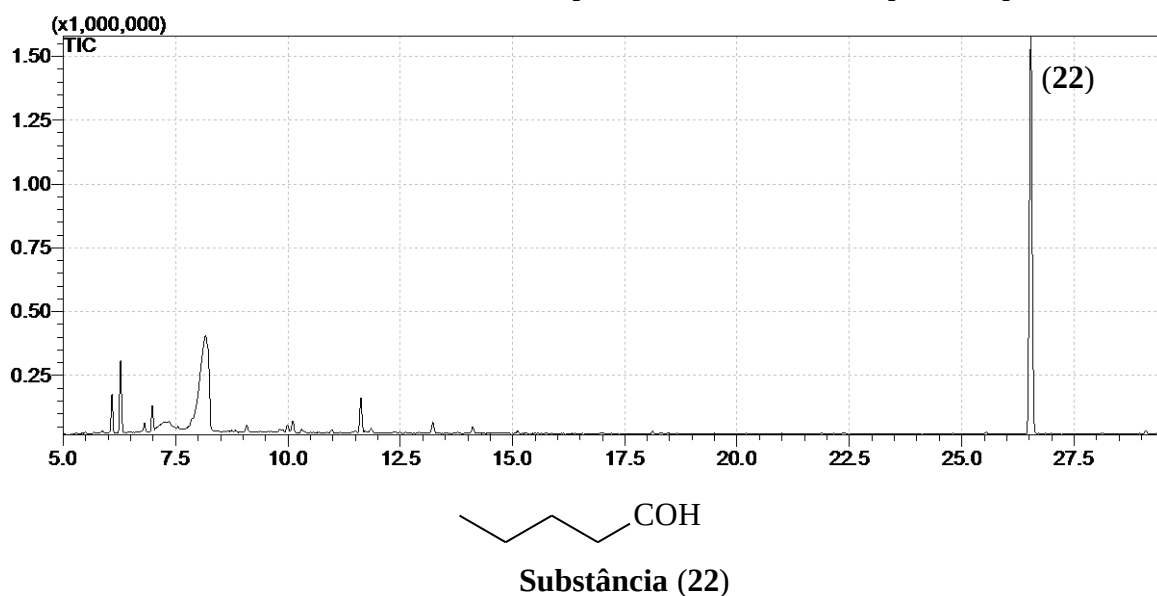
Tabela 5- Compostos identificados como monoterpenos do OE de *M. piperita*. Os t_R (min.) foram obtidos por CG-EM.

Composto	t _R	Porcentagem relativa (%)	IK*	IK
<i>p</i> -Cimeno	11.43	1.4	1658	1506
γ-Terpineno	12.76	2.2	1059	1110
Carvacrol	23.25	46.4	1299	1345
Metil-eugenol	27.72	10.56	1403	1450
Cariofileno	29.08	10.43	1419	1422
Trans-α-bergamoteno	29.34	0.32	1434	1425
Total		71.31		

t_R= tempo de retenção; IK* = Índice de Kovats (ADAMS, 2012); IK = Índice de Kovats calculado.

Em análise por CG-EM do óleo essencial de *M. pulegium* foi identificado um composto, representando (48,4%) do óleo. O componente químico majoritário encontrado foi o Pentanal (22). O pico do composto pode ser observado no cromatograma e suas respectivas fórmulas estruturais, conforme **Figura 14**.

Figura 14- Cromatograma obtido por CG do óleo essencial de *M. pulegium*. Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 60 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 3 °C/min. até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 30,0 min.



O espectro de massa foi comparado com espectro de massas na biblioteca do equipamento Wily/PBM do sistema CG-EM. Esta comparação e identificação do constituinte presente no OE de *M. pulegium* encontram-se na **Figura 15**, e o seu respectivo tempo de retenção e porcentagem constam na **Tabela 6**.

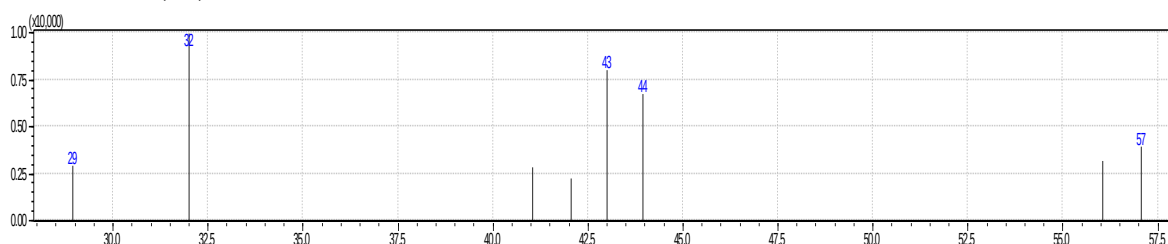
Tabela 6- Compostos identificados do OE de *M. pulegium*. Os t_R (min.) foram obtidos por CG-EM.

Composto	t _R	Porcentagem relativa (%)	IK*	IK
Pentanal	26,55	48,4	706	716
Total		48,4		

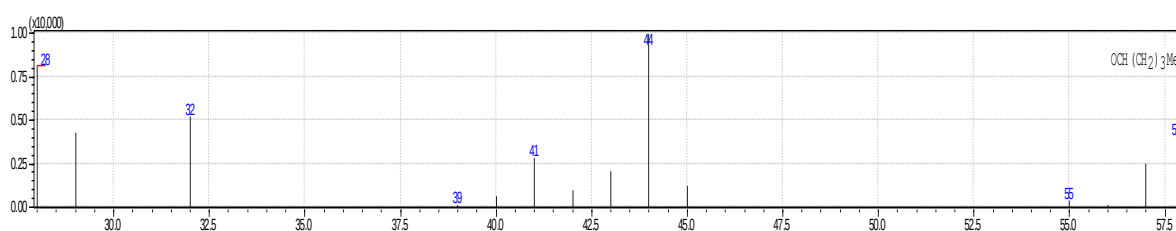
t_R= tempo de retenção; IK* = Índice de Kovats (ADAMS, 2012); IK= Índice de Kovats calculado.

Figura 15 - Espectros de massas do óleo essencial obtidos por CG-EM em comparação com espectro obtido da biblioteca do equipamento.

Substância (22) – Pentanal



Espectro de massas da biblioteca



O espectro de massa da espécie *M. spicata* foi comparado ao espectro da biblioteca do equipamento e o componente majoritário pode ser observado e sua respectiva porcentagem relativa, consta na **Tabela 7**.

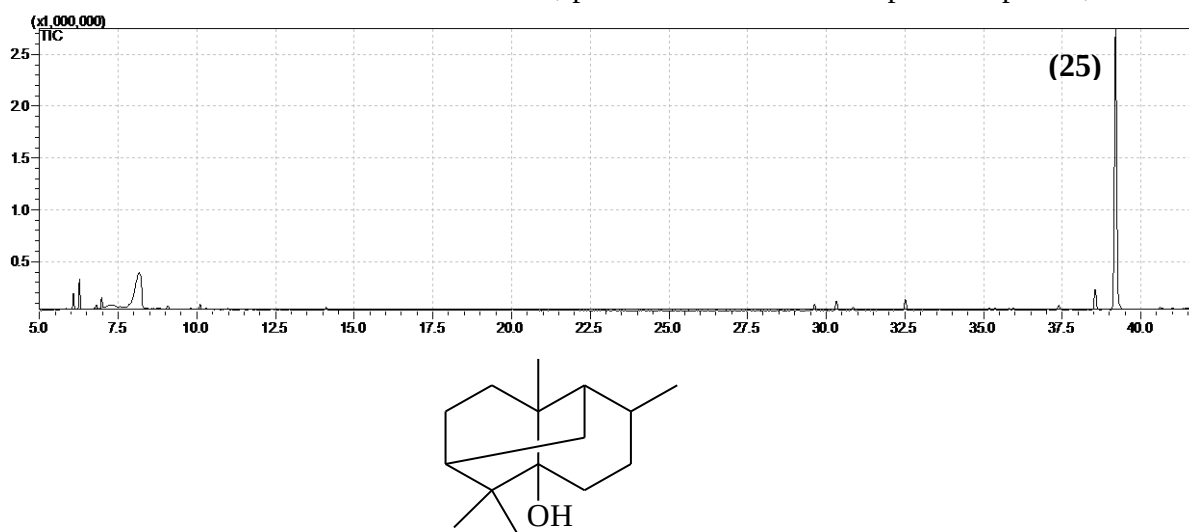
Tabela 7- Composto identificado do OE de *M. spicata*. Os t_R (min.) foram obtidos por CG-EM.

Composto	t _R	Porcentagem relativa (%)	IK*	IK
Limoneno (23)	8.48	23.4	1029	1034
1,8-Cineol (24)	8.60	36.12	1031	1043
Total		59.52		

t_R= tempo de retenção; IK* = Índice de Kovats (ADAMS, 2012); IK= Índice de Kovats calculado.

Em análise por GC-MS do óleo essencial de *P. heyneanus* foi identificado um composto, o Patchouli álcool (25), representando (56,4%) do óleo essencial. O pico do composto pode ser observado no cromatograma e sua respectiva fórmula estrutural, conforme **Figura 16**.

Figura 16- Cromatograma obtido por CG do óleo essencial de *P.heyneanus*. Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 60 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 3 °C/min. até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 30,0 min.

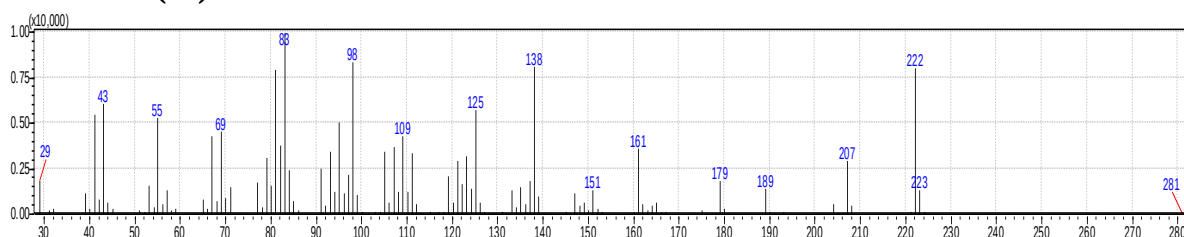


Substância (25)

O espectro de massa foi comparado com espectro de massas na biblioteca do equipamento Wily/PBM do sistema CG-EM. Esta comparação e identificação do constituinte presente no OE de *P. heyneanus* encontram-se na **Figura 17**, e o seu respectivo tempo de retenção e porcentagem constam na **Tabela 8**.

Figura 17 - Espectros de massas do óleo essencial obtidos por CG-EM em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento.

Substância (25) – Patchouli álcool



Espectro de massas da biblioteca

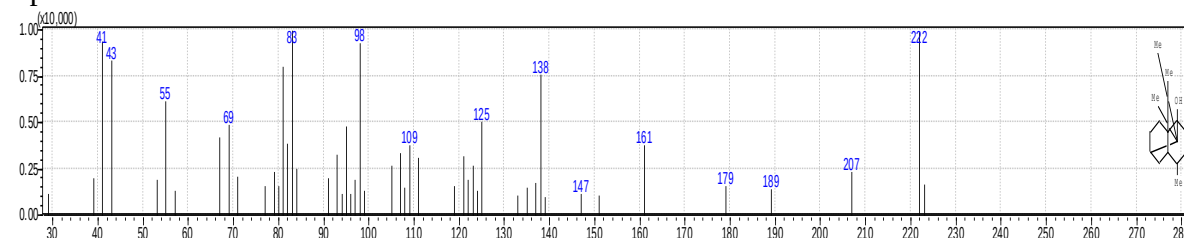


Tabela 8- Compostos identificados como monoterpênos do OE de *P. heyneanus*. Os t_R (min.) foram obtidos por CG-EM.

Composto	t _R	Porcentagem relativa (%)	IK*	IK
Patchouli álcool	39.2	56.4	1658	1506

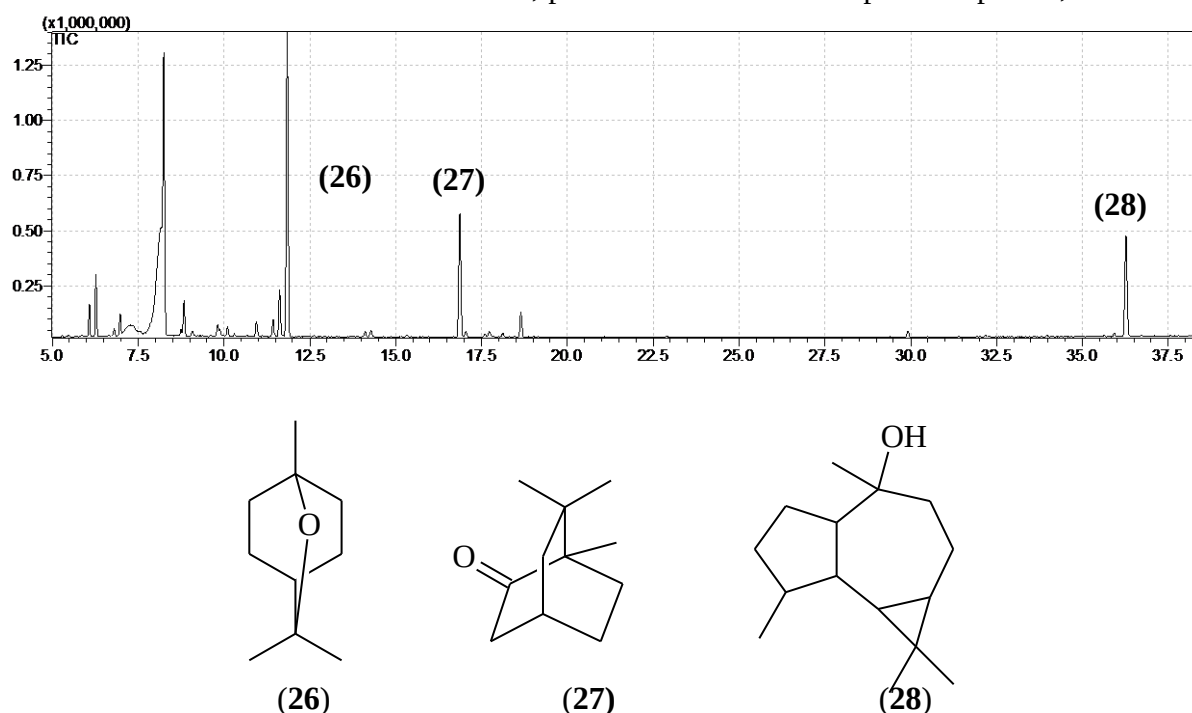
Total	56.4
-------	------

t_r = tempo de retenção; IK^* =Índice de Kovats (ADAMS, 2012); IK = Índice de Kovats calculado.

Murugan et al. (2010) analisaram a composição química da *P. heyneanus* por GC-MS e identificaram a presença de 36 compostos, sendo que os componentes majoritários foram acetophenone (51,0%), beta-pinene (5,3%), (E)-nerolidol (5,4%), e álcool patchoulil (14,0%), no entanto, nesse estudo observou-se apenas a ocorrência relativa do álcool Patchouli.

Em análise por CG-EM do óleo essencial de *H. crenata* foram encontrados 3 compostos e identificados, representado (56,85%) do óleo, sendo estes caracterizados como monoterpenos oxigenados e sesquiterpenos. Os componentes químicos majoritários encontrados foram: 1,8-cineol (**26**), Cânfora (**27**) e Viridifloral (**28**). Os picos dos compostos podem ser observados no cromatograma e suas respectivas fórmulas estruturais, conforme **Figura 18**.

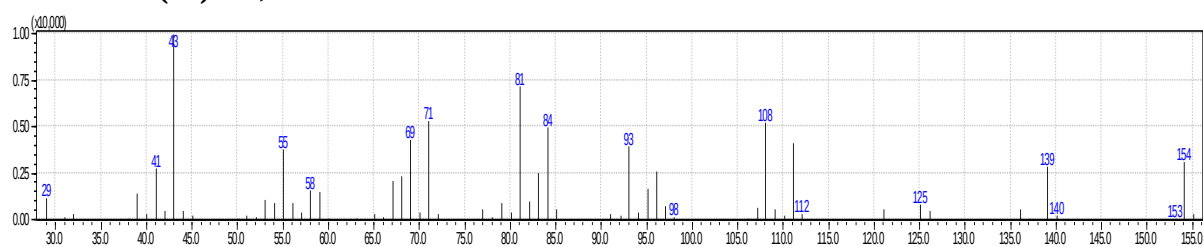
Figura 18- Cromatograma obtido por CG do óleo essencial de *H. crenata*. Condições: Gás de arraste: Hélio (He); temperatura inicial de 60 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 3 °C/min. até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 30,0 min.



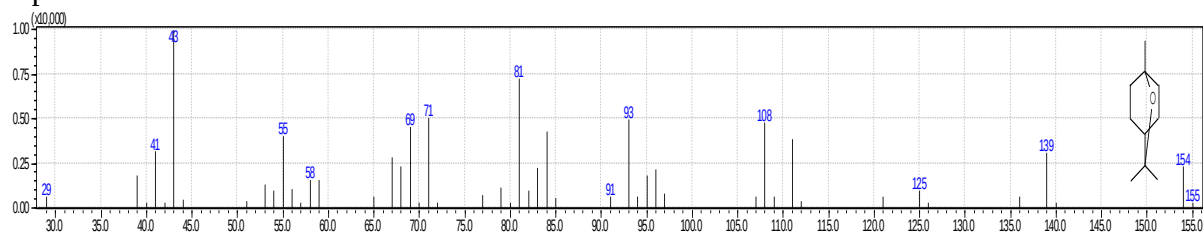
Os espectros de massas foram comparados com espectros de massas de monoterpenos encontrados na biblioteca do equipamento Wily/PBM do sistema CG-EM. Esta comparação e identificação dos constituintes presentes no OE de *H. crenata* encontram-se na **Figura 19**, e os seus respectivos tempos de retenção e porcentagens constam na **Tabela 9**.

Figura 19 - Espectros de massas do óleo essencial obtidos por CG-EM em comparação com espectros obtidos da biblioteca do equipamento.

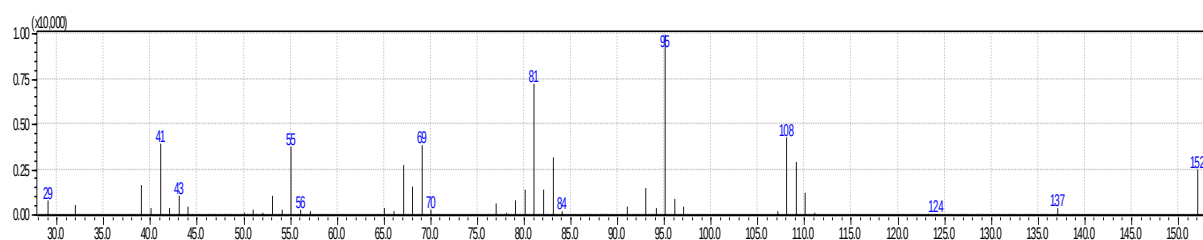
Substância (26) – 1,8-Cineol



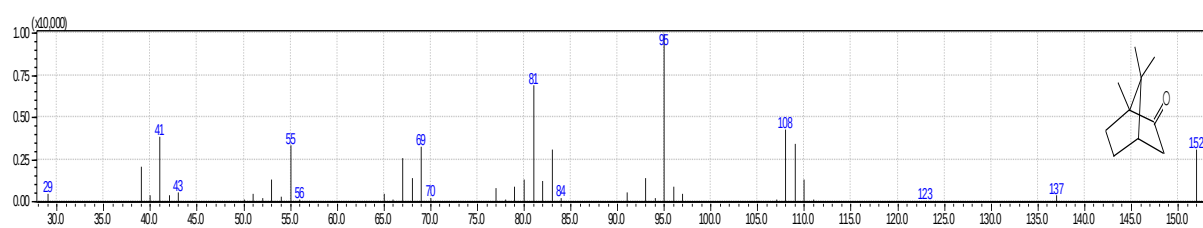
Espectro de massas da biblioteca



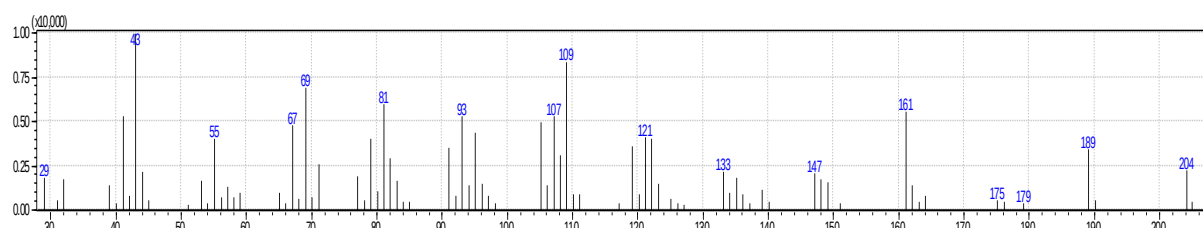
Substância (27)- Cânfora



Espectro de massas da biblioteca



Substância (28)- Viridifloral



Espectro de massas da biblioteca

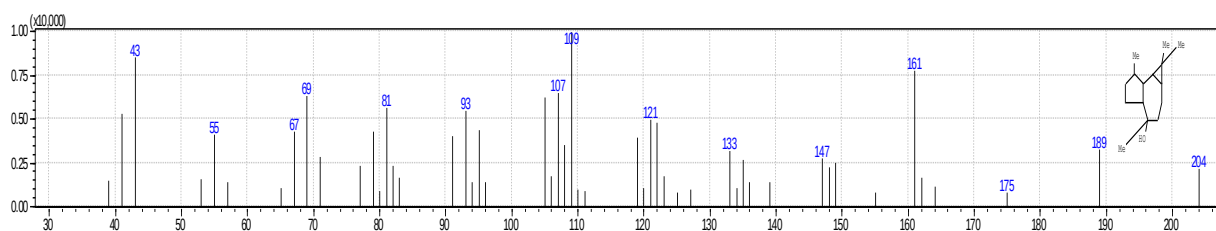


Tabela 9- Compostos identificados como monoterpênicos do OE de *H. crenata*. Os t_R (min.) foram obtidos por CG-EM.

Composto	t _R	Porcentagem relativa (%)	IK*	IK
1,8 Cineol	11.85	32.5	1031	1043
Canfora	16.87	14.7	1147	1137
Viridifloral	32.27	9.65	1592	1492
Total		56.85		

t_R= tempo de retenção; IK* = Índice de Kovats (ADAMS, 2012); IK= Índice de Kovats calculado.

Os valores de IK calculados para os óleos essenciais se mostraram próximos aos encontrados na literatura, pois diversos fatores como calibração do equipamento podem influenciar na determinação e identificação dos compostos.

5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante (capacidade ou potencial antioxidante) é um parâmetro utilizado vastamente para caracterizar diferentes materiais biológicos. Esta atividade está relacionada com compostos capazes de proteger um sistema biológico contra os efeitos danosos de processos ou reações que causam oxidação excessiva, envolvendo espécies reativas de oxigênio (FERRONATTO et al., 2006).

A grande maioria dos compostos com propriedade antioxidante possui uma estrutura molecular com pelo menos um anel aromático e um grupo hidroxila, incluindo os fenóis, flavonoides e isoflavonas, ésteres, ligninas, cumarinas, flavonas e protoantocianidinas oligoméricas. Em misturas esses compostos produzem um arranjo de antioxidantes que podem agir por diferentes mecanismos para conferir um sistema de defesa efetivo contra os radicais livres (RAVELLI, 2011). De acordo com Andrade et al. (2012), os álcoois são a segunda classe de monoterpênicos oxigenados, que compõem os óleos essenciais, mais ativos em atividade oxidantes.

Os valores médios da porcentagem de atividades antioxidante (%AA) dos óleos essenciais realizados neste trabalho podem ser observados na **Tabela 10**.

Tabela 10- Resultados das atividades antioxidantes dos óleos essenciais.

Espécies	Concentração (mg.mL ⁻¹)					
	5	1	0.75	0.5	0.25	CI ₅₀
<i>R. officinalis</i>	41.0±0.3 ^a	25.7±0.5 ^{bf}	24.6±0.5 ^{cf}	24.3±0.6 ^d	21.4±0.7 ^{ef}	7.3
<i>O. gratissimum</i>	16.2±2.7 ^a	12.3±0.6 ^{bf}	11.1±1.2 ^{cf}	10.9±1.2 ^{df}	9.2± 1.5 ^{ef}	31.74
<i>O. micranthum</i>	21.4±1.4 ^{ae}	15.8±0.4 ^{bf}	18.4±3.8 ^{af}	15.9±0.6 ^{cf}	15.4±0.6 ^{df}	29.8
<i>O. basilicum</i>	67.4±1,1 ^a	45.8±0,9 ^b	35.8±2,6 ^c	23.6±1,3 ^d	18.0±2,7 ^e	2.83
<i>M. piperita</i>	79.9± 1.7 ^a	54.9±1.8 ^{bf}	53.0±0.3 ^{cf}	47.2±0.5 ^{dg}	47.6±1.04 ^{eg}	0.54
<i>M. pulegium</i>	56.0±0.2 ^a	31.7± 0.6 ^b	26.1±4.5 ^{cf}	22.5±0.1 ^{df}	16.2 ± 0.3 ^e	4.7
<i>M. spicata</i>	27.3± 2.0 ^a	22.8± 1.9 ^a	20.9± 8.0 ^a	7.6±2.4 ^{bd}	3.6± 2.1 ^{cd}	10.5
<i>P. heyneanus</i>	89.4±0.3 ^a	33.1±0.3 ^{bf}	33.6±0.04 ^{cf}	33.9±0.6 ^{df}	41.6±0.2 ^{eg}	1.8
<i>H. crenata</i>	26.4±1.2 ^a	19.5±1.5 ^{bf}	19.3±3.9 ^{cf}	17.9±1.3 ^{df}	17.1±1.1 ^{ef}	17.8

Na horizontal, valores de (%AA) seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas para Anova ($p < 0.05$).

A análise da composição química do óleo essencial de *R. officinalis* identificou a presença do composto responsável pela atividade antioxidante o 1,8 Cineol (45,7%), com valores significativos com $p(\text{valor}) < 0,0001$ na concentração de 5 mg.mL⁻¹ com (%AA) de 41,0±0,3. A determinação através de regressão linear da Concentração de Inibição de 50% (CI₅₀) apresentou valor de 7,3 mg.mL⁻¹ e forte coeficiente de correlação (R^2) de 0,9961. Estudos realizados por Bertolin et al (2010) usando o óleo essencial de alecrim mostraram potencial antioxidante intermediário, em torno de 36% no tempo de 45 dias, o que evidencia o alto valor inicial da atividade antioxidante e posterior queda com o processo de degradação oxidativo. Assim, Ravelli (2011) determinou no extrato hidroalcoólico uma (%AA) de 91,87, no qual foi classificado como de alta ação de atividade sequestradora de DPPH por ser superior a 70%.

O estudo da composição química do óleo essencial de *O. gratissimum* segundo dados da literatura atribuem atividade antioxidante ao composto eugenol (MIRANDA, 2010). No entanto, diversos fatores influenciam no quimiotipo da espécie, e nesta pesquisa o constituinte majoritário foi *p*-cinemo (16,6%), evidenciando a baixa atividade oxidante em 100 mg.mL⁻¹ com (%AA) de 16,2±2,7. A regressão linear realizada para cálculo de CI₅₀ apresentou valor de 31,74 mg.mL⁻¹ e coeficiente de correlação (R^2) de 0,8857.

Em estudo realizado por Miranda (2010) no óleo essencial das folhas frescas e secas de *O. gratissimum* apresentou expressiva atividade antioxidante nas maiores concentrações testadas com valores médios de 92,2% para o padrão de eugenol, 89,1% para o óleo essencial das folhas frescas e 85,7% nas folhas secas, onde possivelmente atribui-se esses valores a presença do eugenol 77,97 e 70,97%, respectivamente. A estrutura fenólica do eugenol permite a doação de um hidrogênio radicalar para o radical DPPH, reduzindo-o.

A espécie *O. migranthurum* apresentou resultados de %AA na concentração de 5 mg.mL⁻¹ de 21,3972±1.371, considerado baixo com valores estatísticos significativos com com *p* (valor) de 0,0358. O teste de regressão linear feito para cálculo de Concentração de Inibição de 50% (CI₅₀) apresentou valor de 29,78 mg.mL⁻¹ e coeficiente de correlação (R²) de 0,8998.

Na pesquisa de Sacchetti et al. (2004) do óleo essencial de *O. migranthurum* sobre a atividade antioxidante em comparação ao óleo essencial comercial, o óleo extraído apresentou boa capacidade antioxidante com valor de 76,61±0,33% do radical, com valores mais elevados do que os relatados para óleos da espécie na literatura. A expressiva atividade antioxidante é associada à presença do composto majoritário eugenol (46,55±5,11%), conforme pesquisa.

O estudo da composição química óleo essencial de *O. basilicum* identificou a presença do Linalol (20%) possivelmente responsável pela atividade antioxidante significativa com *p* <0,0001 na concentração 100 mg.mL⁻¹ com %AA de 67,35±1,109. O teste de regressão linear feito para cálculo de Concentração de Inibição de 50% (CI₅₀) apresentou valor de 2,83 mg.mL⁻¹ e forte coeficiente de correlação (R²) de 0,9919. Existem poucos relatos na literatura sobre a variação de porcentagem dos constituintes químicos. Segundo Silva et al. (1999) isto deve-se a incidência de luminescência, estresse hídrico e diminuição do abastecimento de água, fatores esses que influenciam diretamente no rendimento do óleo essencial.

Em estudo realizado por Adeola et al. (2014) da atividade antioxidante do óleo essencial de manjerição coletado na Nigéria, os valores foram %AA de 66,98±1,78 e BTH de 53,20±2,51. A média de atividade sequestrante de radicais foi altamente significativa (*p*<0.0001) contra o DPPH com IC₅₀ de 0,084%.

A espécie *M. piperita* apresentou expressiva atividade antioxidante e valor significativo com *p* <0,0001 na concentração 100 mg.mL⁻¹ com %AA de 79,92±1,67. A atividade antioxidante pode estar possivelmente associada à presença do composto majoritário Carvacrol (46,4%). A determinação de (CI₅₀) por regressão linear apresentou valor de 0,54 mg.mL⁻¹ e forte coeficiente de correlação (R²) de 0,9770.

Os resultados de atividade antioxidante da espécie é similar a pesquisa realizada por Derwich et al. (2011) com valores de %AA de $81,09 \pm 1,21$ na concentração de $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e CI_{50} de $53,67 \mu\text{g.mL}^{-1}$. No qual a atividade sequestradora de radicais é associada à presença de compostos mentona e mentol, ambos compostos com presença do radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$). Em estudo similar Bora et al. (2011) avaliaram a capacidade sequestrante do radical DPPH no óleo essencial e determinaram %AA de $92,6 \pm 6,8$, valor este altamente significativo. A espécie *M. piperita* é descrita por vários autores, como potencial agente antioxidante e a relatos descritos na literatura de atividade citotóxica (SHARAFI et al., 2010) e outros descrevem a possível eliminação de cetonas de monoterpênicos (mentona e isomentona) e 1,8-cineol na mudança da composição química da espécie (DERWICH et al., 2011).

A espécie *M. pulegium* apresentou atividade antioxidante com valores significativos $p < 0,0001$ na concentração 100 mg.mL^{-1} com %AA de $56,0 \pm 0,2$. Na análise da constituição química pode-se associar a atividade antioxidante pela presença do composto Pentanal (26,55%). A determinação de (CI_{50}) por regressão linear apresentou valor de $4,7 \text{ mg.mL}^{-1}$ e forte coeficiente de correlação (R^2) de 0,9272.

Os extratos obtidos da partição aquosa, metanólica e de acetona e metanol puro da espécie apresentaram potencial de atividade antioxidante com valor significativo ($p < 0.05$) de 51,76 e 71,78%, respectivamente. Conforme pesquisa de Shahmohamedi et al. (2014), os resultados obtidos do presente estudo indicam que existem diferenças significativas da atividade antioxidante em diferentes métodos de produção de extrato.

A espécie *M. spicata* apresentou baixa atividade antioxidante e valores significativos $p < 0,0001$ na concentração 100 mg.mL^{-1} com %AA de $27,3 \pm 2,0$. A determinação de CI_{50} por regressão linear apresentou valor de $10,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ e coeficiente de correlação (R^2) de 0,3468.

Hussain, Anwar e Shahid (2010) estudaram a composição química e a atividade antioxidante do óleo essencial de *M. spicata*, e observaram que a capacidade de eliminação de radicais livres é dependente da concentração, no qual determinaram CI_{50} de $13,3 \pm 0,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$, este se relaciona com a capacidade do óleo examinado para agir como doador átomos de hidrogênio ou elétrons na transformação de $\text{DPPH}^{\cdot}$ (radicalar) em sua forma reduzida DPPH-H. A capacidade antioxidante foi atribuída à presença dos compostos majoritários *cis*-carveol e carvone, sendo que estas também foram testadas isolados quanto à atividade antioxidante sob as mesmas condições.

A espécie *P. heyneanus* apresentou atividade antioxidante e valores significativos com p (valor) de 0,0073 na concentração 100 mg.mL^{-1} com %AA de $89,4 \pm 0,3$. A atividade antioxidante está associada à presença do composto álcool Patchouli (56,4%) com base na

análise da composição química, pois há poucos estudos relatados na literatura para esta atividade e a pesquisa torna-se pioneira, o que neste sentido vem contribuir para classificação dos quimiotipos identificados na espécie. A determinação de (CI₅₀) por regressão linear apresentou valor de 1,8 mg.mL⁻¹ e coeficiente de correlação (R²) de 0,9020.

A espécie *H. crenata* apresentou baixa atividade antioxidante e valores significativos *p* (valor) de 0,0012 na concentração 100 mg.mL⁻¹ com %AA de 26,4±1,2. A determinação de CI₅₀ por regressão linear apresentou valor de 17,8 mg.mL⁻¹ e coeficiente de correlação (R²) de 0,9690.

A pesquisa realizado por Rebelo et al. (2009) do óleo essencial das folhas e ramos fino e secos de *H. crenata* da atividade antioxidante, puderam observar que o houve capacidade sequestrante significativa de DPPH (CI₅₀, 16,7±0,4 mg.mL⁻¹) foi comparável ao do BHT (19,8 ±0,5 mg.mL⁻¹) e baixa atividade para o óleo. Os valores determinados de (%AA) corroboram aos citados na literatura.

5.3 TESTE DE TOXICIDADE

Os óleos essenciais mostram-se como bons agentes bioativos, pois conforme Meyer et al. (1982), Nascimento et al. (2008) e Rebelo et al. (2009) óleos e extratos de plantas que apresentam valores de concentração letais abaixo de 1000µg.mL⁻¹ são considerados como bioativos. Especificadamente, Nguta et al. (2011) classificaram os extratos vegetais, em graus de toxicidade contra larvas de *A. salina*, conforme intervalo, no qual são considerados com valores de CL₅₀ menores que 100 µg.mL⁻¹ apresentam alta toxicidade, CL₅₀ entre 100 e 500 µg.mL⁻¹ toxicidade moderada, CL₅₀ entre de 500 e 1000 µg.mL⁻¹ fraca toxicidade e CL₅₀ acima de 1000 µg.mL⁻¹ são considerados atóxicos.

A **Tabela 11** refere-se às leituras de mortalidade média realizada no período de 48 h, da atividade larvicida dos óleos essenciais de espécies da família Lamiaceae. Os resultados são significativos e expressos em porcentagem de mortalidade (%).

Tabela 11 - Resultados do teste de toxicidade dos óleos essenciais da espécie da família Lamiaceae frente às larvas de *Artemia salina*.

MORTALIDADE (%)								
Concentração (µg.mL ⁻¹)								
Espécies	1250	1000	500	250	100	10	1	CL ₅₀
<i>R. officinalis</i>	100 ^a	100 ^a	100 ^a	89.5 ^b	76.7 ^c	22.8 ^d	0 ^e	65.2
<i>O. gratissimum</i>	98.6 ^a	96.7 ^a	91.7 ^a	88.7 ^b	68 ^c	21.7 ^d	0 ^e	73.5
<i>O. micranthum</i>	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	98 ^a	64.4 ^b	0.8

<i>O. basilicum</i>	98.6 ^a	98.32 ^a	97.7 ^a	63.3 ^b	19.6 ^c	1.5 ^d	0 ^e	197.5
<i>M. piperita</i>	95.4 ^a	80.7 ^b	60.3 ^c	45 ^d	20 ^e	12 ^e	0 ^f	414.6
<i>M. pulegium</i>	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	25.8 ^b	1.9 ^c	0 ^d	125
<i>M. spicata</i>	100 ^a	100 ^a	98.8 ^a	94.9 ^a	81.9 ^b	0 ^c	0 ^c	61
<i>P. heyneanus</i>	100 ^a	100 ^a	92.6 ^a	64.4 ^b	23.9 ^c	0 ^d	0 ^d	194
<i>H. crenata</i>	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	56.7 ^b	0 ^c	8.8

Caracteres minúsculos diferentes representam diferenças significativas na mortalidade entre as concentrações dos óleos.

O óleo essencial de *R. officinalis* com CL₅₀ de 65,2 µg.mL⁻¹, coeficiente de correlação 0,7053 é considerado altamente tóxico frente as larvas de *Artemia salina*. Pois, segundo Malaquias et al. (2014) esta planta apresenta atividade celular antiproliferativa, e a mesma é atribuída à ação dos compostos químicos rosmarinidifenol, rosmariquinona e rosmanol. No entanto, a ausência destes compostos em menor porcentagem absoluta ainda possibilitou expressiva ação tóxica.

Em estudos realizados por Hussain et al. (2010) do óleo essencial de *R. officinalis* da atividade antiproliferativa de células de câncer (MCF-7 e LNCaP) e um fibroblasto (NIH-3T3), os resultados encontrados enquadram-se dentro das diretrizes publicadas, onde o IC₅₀ entre 100-1000µg.mL⁻¹, considerados potencialmente nocivos.

O óleo essencial de *O. gratissimum* apresentou CL₅₀ de 73,5 µg.mL⁻¹ e coeficiente de correlação 0,7369, confirmando sua bioatividade de alta toxicidade frente *A. salina*. A toxicidade observada, desaconselha o uso interno de monopreparados à base das inflorescências desta planta. Segundo Kpoviessi et al. (2012), no estudo da atividade citotóxica foi observado que o óleo essencial de *O. gratissimum*, mostrou toxicidade contra as larvas de *Artemia salina*, com os valores de CL₅₀ nos intervalo de 43-146 µg.mL⁻¹ para os diferentes dias de coleta e estágio vegetativo. Os resultados encontrados nesta pesquisa enquadram-se nos intervalos de CL₅₀ descrito por diversos autores e mostra o grande potencial da espécie coletada na região amazônica.

Nos estudos de Silva et al. (2010) na avaliação preliminar da atividade citotóxica do óleo essencial de *O. gratissimum* coletado no Rio Grande do Sul, os resultados, tanto para o óleo essencial das inflorescências [CL₅₀ 233,8 (200,7-272) µg.mL⁻¹] quanto para o eugenol [CL₅₀ 186,1 (144,1-228.5) µg.mL⁻¹] apresentaram toxicidade sem diferenças estatísticas entre si.

O óleo essencial de *O. migranthurum* com CL₅₀ de 0,8 µg.mL⁻¹ e coeficiente de correlação 0,6470, confirma sua bioatividade de alta toxicidade frente *A. salina*. Dessa forma,

surge uma grande preocupação com a utilização dessa espécie por comunidades tradicionais para fins condimentares, no entanto, não existem relatos sobre a toxicidade da espécie para humanos.

Em seu estudo Pinho (2010) avaliou as propriedades farmacológicas do óleo essencial de *O. micranthum* e seu principal constituinte, o cinamato de metila, em vias aéreas de ratos Wistar, e foi evidenciado que tanto o óleo essencial quanto o cinamato de metila não interferem no tônus basal de traqueias de ratos, porém é capaz de reverter e bloquear a resposta contrátil induzida por cloreto de potássio e carbacol, resultados estes comprovam que o óleo essencial não provocou efeitos adversos no tônus basal dos ratos.

O óleo essencial de *O. basilicum* apresentou CL_{50} de $197,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e coeficiente de correlação 0,7369, confirmando sua bioatividade de moderada toxicidade frente *A. salina*. Há poucos estudos na literatura disponível sobre a toxicidade de *Ocimum spp.* No entanto, para a espécie *O. basilicum*, que parece ser a mais utilizada medicinalmente, contém diversos compostos tóxicos. Alguns destes compostos são: safrol, rutina, ácido cafeico, o triptofano e quercetina (KHUON, 2012).

Em estudo realizado por Khuon (2012) no qual foi investigado o efeito farmacológico das folhas de *O. basilicum* contra a hepatotoxicidade induzida pelo paracetamol em ratos machos, foi verificado que o paracetamol causou um aumento no nível da Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina (ALP) significativa, e não significativo aumento no colesterol e os níveis de globulina em comparação com os ratos do grupo normal, igualmente tratados com paracetamol causaram diminuição na proteína e níveis de albumina comparado com os ratos normais, mas não significativa. O extrato aquoso de *O. basilicum* foi eficaz na proteção de ratos contra a hepatotoxicidade induzida por paracetamol, isto pode envolver a proteção e redução do estresse oxidativo.

O óleo essencial de *M. piperita* com CL_{50} de $414,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e coeficiente de correlação 0.7443, confirmando sua bioatividade de moderada toxicidade frente *A. salina*. O óleo de *Mentha spp.* tem uma ação calmante de dor e é utilizado clinicamente como um ingrediente em muitos cremes analgésicos e no tratamento de artrite e outras condições músculo-esquelética. O composto químico menthol alivia o desconforto por modulador aferentes, causando impulsos de dor, como parte de um efeito adstringente, e excitando os nervos que reconhecem a sensação de frio (PEIXOTO et al., 2009).

Conforme Peixoto et al. (2009) muitos efeitos colaterais perigosos e letais têm sido relatado em relação a produtos à base de plantas. Estes efeitos secundários podem ocorrer

através de vários mecanismos diferentes, incluindo toxicidade direta, contaminação e interações com drogas ou outras ervas. O óleo essencial de *M. piperita* é associado com efeitos secundários, tais como azia, náuseas, vômitos, reações alérgicas, rubor e dores de cabeça.

O óleo essencial de *M. pulegium* apresentou CL_{50} de $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e coeficiente de correlação 0.60, confirmando sua bioatividade de moderada toxicidade frente *A. salina*. Em estudo realizado por Mozaffari et al. (2013) para testar o efeito tóxico contra o ácaro *Tetranychus urticae* Koch (Tetranychidae) os resultados indicaram que o óleo de *M. pulegium* teve alta toxicidade sobre ovos e adultos de ácaro-rajado (CL_{50} de 2,57 e 2,25 mL.L^{-1} para os ovos e adultos, respectivamente). Além disso, todas as concentrações testadas apresentaram atividade de oviposição de dissuasão e de repelência sobre adultos de este ácaro. Nesse sentido, o estudo corrobora ao efeito tóxico similar apresentado contra as larvas de *A. salina* e potencial no controle de vetores que causam risco de saúde.

O óleo essencial de *M. spicata* apresentou CL_{50} de $61 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e coeficiente de correlação 0,55, confirmando sua bioatividade de alta toxicidade frente *A. salina*. Na pesquisa de Silva (2011) foram avaliados os efeitos citotóxicos dos óleos essenciais de três espécies, e entre elas a *M. spicata*, resultados demonstraram que todos os fitoconstituintes testados causaram diminuição da viabilidade celular em relação ao grupo controle, no entanto, os óleos essenciais apresentaram efeito citotóxico.

A CL_{50} do óleo essencial de *P. heyneanus* frente ao microcrustáceo *A. salina* foi equivalente a $194 \mu\text{g.mL}^{-1}$, com $p(\text{valor})$ de 0,1141 e coeficiente de correlação 0,6481, portanto, apresenta significativa toxicidade. É importante ressaltar que em relação à espécie, não existem informações especificadamente para *A. salina*.

O óleo essencial de *H. crenata* apresentou um valor de CL_{50} equivalente a $8,81 \mu\text{g.mL}^{-1}$, com p -valor correspondente a 0,33 e coeficiente de correlação de 0,4324. A toxicidade encontrada foi semelhante aos valores de Rebelo (2009), quando analisou em quatro concentrações que variaram de 1 a $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, determinando a CL_{50} de $6,7 \pm 0,2$ de amostras coletadas no município de Salvaterra, localizado na Ilha do Marajó-PA. Estudos de Lima et al. (2011) associaram a elevada toxicidade de amostras de óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham. aos monoterpenos 1,8-cineol ou ao Carvacrol, amplificada pela presença do timol. Em análise da composição química da espécie neste estudo, foi encontrado o composto 1,8-cineol (32,5%), indo ao encontro dos compostos com elevada toxicidade indicado pela literatura.

5.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os produtos naturais têm se tornando uma excelente alternativa terapêutica, de modo que as pesquisas por compostos vegetais que tenham alguma propriedade medicamentosa tem se intensificado consideravelmente nos últimos anos. Isso tem despertado novos olhares para região amazônica, pois sua flora é estimada em mais de 55 mil espécies e menos de 1% foi estudada cientificamente (NADER, 2010; HAIDA et al., 2007).

As bactérias gram-positivas protegem sua membrana citoplasmática com uma parede celular espessa. As muitas camadas de peptidoglicano impedem a passagem de compostos hidrofóbicos, devido à presença de açúcares e aminoácidos. A membrana externa apresenta características lipoproteicas e por esse motivo as bactérias necessitam dispor de um mecanismo que permitam a entrada de compostos hidrofílicos como açúcares, aminoácidos e certos íons. Por isso a membrana externa possui canais especiais chamadas de porinas, que permitem a difusão passiva de compostos hidrofílicos. O mecanismo pelo qual a maioria desses óleos exerce seu efeito antimicrobiano é agindo diretamente na estrutura da parede celular bacteriana, desnaturando e coagulando as proteínas. Mais especificamente, atuam alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática por íons de hidrogênio (H^+) e potássio (K^+). A alteração dos gradientes de íons conduz à deterioração dos processos essenciais da célula como transporte de elétrons, translocação de proteínas, etapas da fosforilação e outras reações dependentes de enzimas resultando em perda do controle quimiosmótico da célula afetada e consequentemente a morte bacteriana (DORMAN; DEANS, 2000; PRETTO, 2005).

As **Tabela 12** e **13** referem-se aos resultados de medição do halo de inibição dos óleos essenciais de espécies da família Lamiceae (expressos em mm) contra cepas das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Tabela 12- Resultados de medição dos halos de inibição dos óleos essenciais de espécies da família Lamiaceae contra cepas de *Staphylococcus aureus*.

Espécies	Halos de inibições (mm)			
	100 mg.mL ⁻¹	50 mg.mL ⁻¹	10 mg.mL ⁻¹	1 mg.mL ⁻¹
<i>R. officinalis</i>	NA	NA	NA	NA
<i>O. gratissimum</i>	10±0.0	8.8±1.2	7.3±0.6	NA
<i>O. micranthum</i>	NA	NA	NA	NA
<i>O. basilicum</i>	11.3±0.6	11.6±1.1	7±0.0	NA
<i>M. piperita</i>	7.6± 0.57	NA	NA	NA
<i>M. pulegium</i>	NA	NA	NA	NA

<i>M. spicata</i>	11.5±0.5	11±0.0	7.0±0.0	NA
<i>P. heyneanus</i>	NA	NA	NA	NA
<i>H. crenata</i>	13.6±0.6	11.3±1.1	7±0.0	6.8±0.8

NA=não apresentou halo de inibição.

Tabela 13- Resultados de medição dos halos de inibição dos óleos essenciais de espécies da família Lamiaceae contra cepas de *Escherichia coli*.

Espécies	Halos de inibições (mm)			
	100 (mg.mL ⁻¹)	50 (mg.mL ⁻¹)	10 (mg.mL ⁻¹)	1 (mg.mL ⁻¹)
<i>R. officinalis</i>	8.6±2.0	9±1.0	7±0.0	8.6±0.6
<i>O. gratissimum</i>	7.6±1.15	7.3±0.6	8±1	9.3±1.5
<i>O. micranthum</i>	9.6±0.6	9±1.0	6.5±0.5	NA
<i>O. basilicum</i>	NA	NA	8.3±1.6	8.6±1.15
<i>M. piperita</i>	7.6 ± 0.57	7±0.0	9±1.0	7.3±0.57
<i>M. pulegium</i>	8±0.0	8.3±1.54	8.6±0.57	7.6±1.15
<i>M. spicata</i>	NA	8.6±0.6	6±0.0	6.3±0.6
<i>P. heyneanus</i>	10±1.0	7.3±0.6	8.3±0.6	NA
<i>H. crenata</i>	9.3±0.3	10±0.0	8±0.6	7±0.0

NA=não apresentou halo de inibição.

O óleo essencial de *R. officinalis* não apresentou halo de inibição contra *S. aureus*, os resultados demonstram que o óleo essencial tem mais poder de inibição sobre Gram-negativas em relação a Gram-positivas. Pois, foi observado formação de halo na concentração de 50 mg.mL⁻¹ (9±1,0mm) para *E.coli*. O uso do óleo essencial e extrato vegetal de *R. officinalis* como agente antimicrobiano têm sido relatado por diversos autores Pereira et al. (2006), Hentz e Santin (2007), Genena et al. (2008), Silva et al. (2008), Arashiro et al. (2011), Ribeiro (2011), Steffens (2010), Cavalcanti et al. (2011), Ribeiro et al. (2012), Gandra et al. (2013) e Gauch et al. (2014).

Porte e Godoy (2001) e Genena (2008) afirmam, que em óleos essenciais de *R. officinalis*, de diferentes partes do Egito, foram encontradas atividades inibitórias contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Mycobacterium intracellulerae*, mas nenhuma atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* e *Trichophyton mentagrophytes*. Os principais componentes que o óleo de alecrim egípcio foram: cânfora, α -pineno e 1,8-cineol, então acredita-se, que estes sejam os responsáveis pela atividade antimicrobiana do óleo.

Segundo Ribeiro (2011), Porto e Godoy (2001), os monoterpenos são os compostos majoritários presentes no óleo de *R. officinalis*. No entanto, considerando os óleos provenientes dos países essencialmente produtores dentro dos padrões internacionais, ainda há discrepância entre as principais substâncias (hidrocarbonetos como pineno, mirceno ou oxigenados como canfora, 1,8-cineol e borneol). Esses autores relatam ainda que a fraca atividade antimicrobiana do óleo, frente a alguns microrganismos, é devido à ausência de núcleos aromáticos contendo um grupo funcional polar nos principais compostos do óleo.

O óleo essencial de *O. migranthurum* não apresentou sensibilidade a bactéria *S. aureus* nas concentrações testadas, no entanto, pode-se observar expressiva sensibilidade a *E. coli* com maior halo de inibição ($9,6 \pm 0,6$ mm) na concentração de 100 mg.mL^{-1} . Estes resultados, de certa forma, contrariam alguns trabalhos relatados na literatura, pois estes afirmam que as bactérias gram-positivas são mais suscetíveis à ação dos óleos essenciais do que as bactérias gram-negativas.

Desse modo, Machado et al. (2012) avaliaram a atividade antimicrobiana da espécie contra as cepas de *S. aureus* e *E. coli* e observaram que houve expressivo halo de inibição do óleo essencial das folhas de $15,5 \pm 0,7$ e $12,5 \pm 2,1$ mm, respectivamente.

Vieira (2009) avaliou o efeito antifúngico do óleo essencial da espécie contra cepas de *Candida* spp. e *Microsporum canis*, os óleos essenciais de *O. micranthurum* e *O. selloi* foram eficazes contra todas as cepas testadas. Observou-se que a MIC de *O. micranthurum* variou de 312,5 a 1250 ng.mL^{-1} e o CFM variou 625-1250 ng.mL^{-1} para as espécies de *Candida*.

O óleo essencial de *O. gratissimum* apresentou halo de inibição para as duas bactérias testadas, na concentração de 100 mg.mL^{-1} com $10 \pm 0,0$ mm para *S. aureus* e 1 mg.mL^{-1} com $9,3 \pm 1,5$ mm para *E. coli*, respectivamente. A expressiva atividade antibacteriana é provavelmente devido à presença de Carvacrol (38,6%) como componente majoritário, embora não se deve descartar a possibilidade de sinergismo entre os demais componentes do óleo essencial, mesmo que presentes em menores concentrações.

No estudo realizado por Almeida et al. (2013) na avaliação do potencial antimicrobiano do óleo essencial de *O. gratissimum* e cravo-da-índia em carne moída de ovinos contaminadas experimentalmente com *S. aureus*, os óleos essenciais analisados apresentaram atividade antimicrobiana na matriz alimentar utilizada, entretanto, apenas o óleo essencial do cravo-da-índia apresentou maior efeito inibitório no tempo de 60 minutos em relação aos demais tratamentos ($p \leq 0,001$). Dessa forma, compara-se o baixo efeito antimicrobiano ao relatado na literatura.

Em comparação a ação antimicrobiana dos extratos metanólicos e hexânicos de *O. gratissimum*, estes apresentaram grande potencial contra as bactérias *S. aureus* e *E. coli* com expressivas concentrações mínimas inibitórias, resultados estes devido a presença de compostos com reconhecida atividade antibacteriana e com características polares, por exemplo, como taninos, flavonóis e terpenos, extraídos principalmente por solventes polares como o metanol (MATIAS et al., 2010).

O óleo essencial do *O. basilicum* apresentou atividade antimicrobiana nas bactérias testadas, *S. aureus* e *E. coli*, com halo de inibição de crescimento de $11,6 \pm 1,1$ e $8,6 \pm 1,15$ mm, respectivamente. O estudo está de acordo com a pesquisa realizada por Cunha (2010) sobre a ação do óleo essencial na atividade antimicrobiana em 7 tipos de bactérias, nos quais os resultados dos halos de inibição foram mais expressivos para *S. aureus* e *E. coli* ($13,0 \pm 0,83$ e $13,0 \pm 0,79$ mm) para os óleos extraídos das folhas frescas.

Na espécie vegetal, neste de estudo, foram identificados na constituição química, com destaque, os terpenos limoneno, eucaliptol, linalol e o fenilpropano metilchavicol. Cunha (2010) e Burt (2004) relatam que o metilchavicol apresenta atividade antibacteriana inferior ao eugenol e a combinação carvacrol/ácido cinâmico, porém superior à atividade do cinamaldeído e citral/geraniol. Desta forma, como relatado por Hussain et al. (2008) a atividade antibacteriana observada na pesquisa, está relacionada ao linalol e a outros metabólitos oxigenados presentes nesta variedade de *O. basilicum*.

O óleo essencial de *M. piperita* apresentou halo de inibição nas concentrações de $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ com $7,6 \pm 0,57$ mm e na de $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ com $9 \pm 1,0$ mm para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. A presença em menor porcentagem de mentol pode ter influenciado a ocorrência apenas em uma cepa de bactéria.

O extrato de *M. piperita*, seja na forma de óleo essencial ou na de extrato alcoólico, segundo a literatura, apresenta propriedades antimicrobianas. O mentol é um importante componente presente nesses extratos e contribui para o potencial antimicrobiano dessa planta (ALVES et al., 2010). Este potencial do óleo essencial de *M. piperita* foi parcialmente comprovado nesse estudo pelos resultados apresentados, mostrando atividade antimicrobiana apenas para a bactéria *E. coli*.

O óleo de *M. pulegium* não apresentou sensibilidade ao crescimento de *S. aureus* com halo 0.00 mm, observa-se sensibilidade ao crescimento de *E. coli* na concentração de $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ com halo de inibição expressivo de $8,6 \pm 0,57$ mm.

A pesquisa de Silva (2014) da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. pulegium*, coletada no Horto de plantas medicinais da Universidade Federal de Lavras

resultados mostrou que os óleos essenciais de *M. pulegium* e *M. viridis* apresentaram a mesma concentração mínima inibitória (MIC) de $62,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ para a bactéria gram-negativa *E. coli*, formando halos de 6 mm na mesma concentração. Para o *S. aureus* houve formação de inibição de 5 mm, considerado baixo.

Estudos realizados por Michelin et al. (2005) mostraram que o extrato metanólico de *M. pulegium* apresentaram pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana até a concentração de 200 mg.mL^{-1} contra cepas padrões de *E. coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27583) e *S. aureus* (ATCC29213), a levedura *Candida albicans* (ATCC 10231) e 11 bactérias resistentes a antibióticos isoladas em ambiente hospitalar. Entretanto, neste estudo o óleo essencial da espécie apresentou moderada sensibilidade ao crescimento de *E. coli*.

O óleo essencial de *M. spicata* apresentou halo de inibição nas concentrações de 100 mg.mL^{-1} com $11,5 \pm 0,5 \text{ mm}$ e na de 50 mg.mL^{-1} com $8,6 \pm 0,6 \text{ mm}$ para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente.

Sartoratto et al. (2005) avaliaram os óleos de *Mentha piperita*, *M. spicata*, *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *O. applii*, *Aloysia triphylla*, *Ocimum gratissimum* e *O. basilicum* quanto à atividade antimicrobiana contra bactérias e contra a levedura *Candida albicans* pelo método de bioautografia. A espécie *M. spicata* apresentou baixa sensibilidade contra as bactérias *S. aureus* com $\text{MIC} > 2 \text{ mg.mL}^{-1}$ e *E. coli* não foi determinado o MIC. A espécie da região amazônica é sensível ao crescimento bacteriano, conforme os resultados encontrados na pesquisa.

Peixoto (2010) no estudo da atividade antimicrobiana de diferentes acessos de *Mentha* spp em *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*, apenas quatro óleos se destacaram, apresentando forte atividade com amplo espectro, sendo *M. canadensis* (CM 05) - ($< 0,007$ a $0,500 \text{ mg/mL}$); *M. spicata* (CM30) ($0,062 \text{ mg/mL}$ a $0,500 \text{ mg/mL}$); *M. arvensis* CM 36 ($< 0,007 \text{ mg/mL}$ a 1 mg/mL) e *M. suaveolens* x *spicata* (CM 52) - ($0,062 \text{ mg/mL}$ a $0,500 \text{ mg/mL}$).

O óleo essencial de *P. heyneanus* não apresentou halo de inibição $0,0 \text{ mm}$ contra *S. aureus*, os resultados demonstram que o óleo essencial tem mais poder de inibição sobre Gram-negativas em relação a Gram-positivas. Pois, foi observado formação de halo na concentração de 100 mg.mL^{-1} de $10 \pm 1,0 \text{ mm}$ para *E.coli*. Os resultados encontrados são inéditos quanto à utilização do óleo essencial da espécie como agente antimicrobiano contra *E.coli*.

Pandey et al. (2012) examinou a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial extraído de 53 plantas aromáticas contra *Erwinia herbicola* (Lohnis) e *Pseudomonas putida*

(Kris Hamilton), entre elas a espécie *P. heyneanus* apresentou baixa sensibilidade com halos de $3,4 \pm 1,6$ e $3,2 \pm 1,0$ mm, respectivamente, contra as duas bactérias.

Souza Filho et al. (2009) caracterizaram a atividade potencialmente alelopática de óleos essenciais de pimenta longa (*Piper hispidinervium* C. DC.) e oriza (*Pogostemon heyneanus* Benth). Os óleos das duas espécies evidenciaram atividade alelopática em intensidades que variaram em função da concentração do óleo, da espécie doadora, da planta receptora e do fator da planta analisado. Aparentemente, a atividade alelopática dos óleos essenciais das duas espécies pode estar relacionada à presença de monoterpenos, monoterpenos oxigenados e sesquiterpenos.

O óleo essencial de *H. crenata* apresentou halo de inibição nas concentrações de 100 mg.mL⁻¹ com $13,6 \pm 0,6$ mm e na de 50 mg.mL⁻¹ com $10 \pm 0,0$ mm para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. Potencialmente o óleo essencial da espécie pode ser utilizado para inibir o crescimento bacteriano.

Violante et al. (2012) no estudo biomonitorado do óleo essencial da espécie, os resultados foram significativos, particularmente a atividade do composto ácido carnósico, contra as cepas de *Candida glabrata* e *Candida krusei* (MIC = 6,25 µg/mL) e contra as bactérias Gram positivas, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* (MIC = 12,5 µg/mL).

Mota (2013) nos testes de atividade antibacteriana feitos nos extratos aquoso e etanólico das folhas e galhos secos indicam atividade bacteriana das linhagens gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa* no extrato aquoso e das linhagens gram-positivas *S. aureus* e *E. fecalis* no extrato etanólico. Dessa forma, a pesquisa está de acordo em análise previa aos resultados encontrados na literatura e evidenciam o potente efeito inibitório da espécie como possível agente antimicrobiano.

Os diâmetros de halo obtidos com antibiogramas de diferentes óleos essenciais não são comparáveis numericamente, pois o diâmetro da zona de inibição de crescimento bacteriano dependerá da habilidade da substância em teste de se difundir uniformemente pelo meio de cultura. A maioria dos óleos essenciais e suas combinações ativas são altamente voláteis e de baixa solubilidade em fase aquosa, fato que limita a utilização comparativa desta técnica (CANSIAN et al., 2010).

5.5 ATIVIDADE LARVICIDA

Diversos estudos comprovam a atividade de óleos essenciais e de extratos vegetais contra diferentes espécies de mosquitos (FURTADO et al., 2005; PORTO et al., 2008;

ACIOLE, 2012) incluindo *A. aegypti* (SOUSA, 2010; AGUIAR, 2012). O estudo do potencial larvicida, inseticida e repelente dos óleos essenciais surge como tecnologia alternativa aos produtos sintéticos para controle do vetor, visto que até o momento não existe vacina pronta para uso contra os quatro sorotipos da dengue. Consideram-se bons agentes com potencial larvicida óleos essenciais ou extratos vegetais com valores de $CL_{50} < 100$ ppm.

Pesquisas para o controle do vetor tem mostrado a eficiência do efeito larvicida de óleos essenciais, na qual identificaram na composição química destes em geral monoterpenos, assim como, alguns sesquiterpenos, os quais servem como agentes repelentes que tem significativa toxicidade contra insetos, mas toxicidade negligenciável para mamíferos. Misturas destes compostos voláteis de baixo peso molecular, denominados óleos essenciais, são os compostos que fornecem às plantas, como hortelã pimenta (*Mentha piperita*), limão (*Citrus limon*), basílico (*Ocimum basilicum*), e sálvia (*Salvia officinalis*), seus característicos odores, e são comercialmente importantes na aromatização de alimentos e na produção de perfumes (SOUSA, 2010; AGUIAR, 2012).

A **Tabela 14** refere-se às leituras de mortalidade média realizada no de período 48 h, da atividade larvicida dos óleos essenciais de espécies da família Lamiaceae. Os resultados são significativos e expressos em porcentagem de mortalidade (%).

Tabela 14 - Resultados da Atividade larvicida do óleo essencial da espécie da família Lamiaceae frente as larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

MORTALIDADE (%)						
Concentração (ppm)						
Espécies	500	400	300	200	130	CL_{50}
<i>R. officinalis</i>	63.4 ^a	40.6 ^b	20.8 ^c	8.6 ^d	1.8 ^e	492.6
<i>O. gratissimum</i>	100 ^a	100 ^a	100 ^a	98.3 ^a	70.9 ^b	76.6
<i>O. micranthum</i>	100 ^a	95.5 ^a	93 ^a	59 ^b	7 ^c	196.5
<i>O. basilicum</i>	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	96.7 ^a	67.2
<i>M. piperita</i>	86.6	66.8	40.8	17	3.378	367.6
<i>M. pulegium</i>	100 ^a	100 ^a	100 ^a	85 ^b	27.5 ^c	157.7
<i>M. spicata</i>	100 ^a	100 ^a	100 ^a	75.10 ^b	12.78 ^c	176.8
<i>P. heyneanus</i>	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	93 ^a	69.9
<i>H. crenata</i>	99.4 ^a	100 ^a	100 ^a	94.5 ^a	72.7 ^b	89.4

Caracteres minúsculos diferentes representam diferenças significativas na mortalidade entre as concentrações dos óleos.

O óleo essencial de *R. officinalis* apresentou baixo potencial larvicida com CL_{50} de 492,6 ppm, com $p(\text{valor})$ significativo 0,0022 e coeficiente de determinação (R^2) de 0,9618. Conti et al. (2010) relata em seus estudos que a espécie *R. officinalis* causou mortalidade de 51% insetos testados em concentrações acima de 300 ppm. Nesse sentido, esta pesquisa torna-se similar, pois nas maiores concentrações houve significativa mortalidade (>50%).

Segundo Govindarajan (2010) em suas pesquisas tem demonstrado o potencial de atividade larvicida de óleos essenciais na seguinte ordem contra *Culex tritaeniorhynchus* Giles e *Anopheles subpictus* Grassi, da seguinte maneira com *Z. officinale* > *R. officinalis* > *C. zeylanicum* > *C. citratos*, e respectivas CL_{50} de 98,83; 115,38; 136,58 e 124,70 ppm para o *C. tritaeniorhynchus* e 57,98; 64,50; 77,24 e 71,96 ppm para o *A. subpictus*.

O óleo essencial da espécie *O. gratissimum* apresentou significativo potencial larvicida com CL_{50} de 76,6 ppm, $p(\text{valor})$ significativo de 0,013 e coeficiente de determinação (R^2) de 0,8013. Cavalcanti et al. (2004) avaliando o potencial larvicida do óleo essencial de plantas brasileiras, determinaram ação larvicida do *O. gratissimum* contra *A. aegypti* com valores de CL_{50} de 60 ppm, considerado com potencial ação larvicida.

Silva et al. (2014) buscaram avaliar o potencial larvicida em larvas de libélulas que são pragas graves que predavam larvas de peixes, pós-larvas, alevinos em tanques, que causam perdas significativas na produção de tanques. Os resultados considerados altamente potente dos óleos das espécies *Hesperozygis ringens* (Benthams) Epling, *Ocimum gratissimum* e *Lippia sidoides*, com CL_{50} de 62,92; 75,05 e 51,65 $\mu\text{L.L}^{-1}$. Resultados estes que corroboram com o uso potencial da espécie para atividade larvicida e repelente em trabalhos futuros para elucidação de mecanismo de ação biológica.

A espécie *O. migranthurum* não apresentou atividade larvicida ideal, pois o valor de CL_{50} foi de 196,5, significativo $p(\text{valor}) < 0,01$ e coeficiente de determinação (R^2) de 0,7553. O gênero *Ocimum* é conhecido por suas propriedades pesticidas, devido à presença diversos compostos em seus óleos essenciais. Segundo o levantamento bibliográfico realizado por Pandey et al. (2014) a espécie em sua composição química tem como composto majoritário o eugenol (64,80%) e o β -cariofileno (14,30%) com relatada atividade larvicida, repelente e inseticida. No entanto, neste estudo a espécie teve baixo potencial larvicida em virtude da baixa ocorrência do eugenol.

Conforme o bioensaio realizado frente às larvas do mosquito *A. aegypti* do óleo essencial das folhas da espécie *O. basilicum* apresentou efeito larvicida com $CL_{50} = 67,22$ ppm, pois de acordo com a literatura (CHENG et al., 2003), substâncias com valores de CL_{50} menores que 100 ppm são considerados bons agentes larvicida. A espécie apresenta grande

potencial para ser utilizada como agente larvicida contra as larvas do mosquito *A. aegypti*, devido à presença em maior parte dos compostos majoritários da classe dos monoterpenos que apresentam relatos na literatura para essa atividade. O óleo essencial de manjerição contém constituintes bioativos que são inseticidas e repelentes (PANDEY et al., 2014).

Estudos realizados por Furtado et al (2005) encontraram valores médios de CL_{50} = 104 mg/mL, e Simas et al (2004) como valores <100 ppm. O estudo comparado aos outros trabalhos apresentou atividade maior que o relatado, indicando assim a possibilidade de outros compostos serem responsáveis pela atividade larvicida do óleo essencial ou ainda a existência de um sinergismo entre o linalol e outros compostos.

Diversos trabalhos realizados por autores (CHENG et al., 2004; THOMAS et al., 2004; TRABOULSI et al., 2005; GOVINDARAJAN, et al., 2013) têm reportado a ação larvicida da espécie com valores em média de CL_{50} = 50 ppm, e atribuindo potencial larvicida a presença do composto majoritário o linalol. Os resultados corroboram com as pesquisas nesse sentido, pois os valores encontrados estão de acordo com os citados na literatura. No qual se deve considerar fatores sazonais, solo, radiação absorvida pela espécie no processo de fotossíntese e estresse ambiental como fundamentais para produção de metabolitos secundários, podendo influenciar na composição percentual dos compostos químicos.

A espécie *M. piperita* conforme o bioensaio apresentou baixo potencial larvicida com CL_{50} de 367,6 ppm, $p(\text{valor}) < 0,01$ e coeficiente de determinação (R^2) de 0,9980, resultados esses significativos. O estudo é similar a pesquisa realizada por Kumar et al. (2011) na avaliação do potencial larvicida da espécie, onde observou o decréscimo de CL_{50} nos períodos de 24 e 48h (111,9 e 98,66 ppm), respectivamente. O efeito torna-se ineficaz para as larvas que, pois a mesmas se desenvolvem em pulpas a adultos no período de 60-72h.

Os óleos essenciais extraídos de plantas diferentes têm sido relatados por ter propriedades larvicida e repelente contra *A. aegypti* (KUMAR et al., 2011; HANAN, 2013). Embora, alguns relatórios estejam disponíveis em relação ao potencial repelente do óleo essencial de *M. piperita* contra insetos, esta pesquisa ganha destaque ao que tange o efeito de avaliação larvicida do mosquito.

A avaliação da atividade larvicida está de acordo com os estudos realizados por Pavela, Kaffková e Kumšta (2014), no qual determinaram valor de $CL_{50} > 100 \text{ mg.L}^{-1}$ contra as lavas de *Culex quinquefasciatus*, tendo como componente majoritário o monoterpeno *L*-(-)-mentol cuja participação no OE diferiu dependendo do genótipo de 20,5% para 57,3%, juntamente com carvona (0,0-56,8%) e óxido de piperitenone (0,0-31,8%).

A *M. pulegium* apresentou conforme bioensaio larvicida baixo potencial com valor de CL_{50} de 157,7 ppm, $p(\text{valor}) < 0,01$ significativo e coeficiente de determinação (R^2) de 0,7532. Na pesquisa de Rocha et al. (2013) os resultados comprovam o efeito larvicida da espécie de Portugal com valor de CL_{99} de $< 183,6 \mu\text{L.L}^{-1}$ e de Cabo Verde CL_{99} de $< 233,966 \mu\text{L.L}^{-1}$, onde análise por RMN de ^{13}C mostrou a presença do composto majoritário a pulegona, seguida da mentona.

Rocha et al. (2013) avaliaram os efeitos inseticidas de plantas de regiões geoclimáticas diferentes e determinaram a CL_{50} de $88,4 \mu\text{L.L}^{-1}$, resultados altamente significativos, classificando a espécie de Portugal como potencialmente larvicida.

A *M. spicata* no bioensaio larvicida apresentou baixo potencial com CL_{50} de 176,8 ppm, $p(\text{valor}) < 0,05$ significativo e coeficiente de determinação (R^2) de 0,8006. Govindarajan et al. (2012) avaliou o potencial larvicida do OE e teve um efeito tóxico significativo contra larvas de terceiro estágio precoce de *C. quinquefasciatus*, *A. aegypti* e *A. stephensi* com CL_{50} valores de 62,62; 56,08 e 49,71 ppm e CL_{90} valores de 118,70; 110,28 e 100,99 ppm, respectivamente. O efeito larvicida foi atribuído à ocorrência relativa de carvona (48,60%), cis-carveol (21,30%) e limoneno (11,30%). Entretanto, neste trabalho houve a ocorrência menos intensa desses compostos, por isso o baixo efeito larvicida.

A espécie *P. heyneanus* apresentou potencial efeito larvicida com valor de CL_{50} de 69,9 ppm, $p(\text{valor}) < 0,05$ significativo e coeficiente de determinação (R^2) de 0,5841. O estudo da atividade larvicida da espécie contra as larvas do mosquito *A. aegypti* ainda é preliminar, e há poucos relatos na literatura para este bioensaio. A pesquisa vem colaborar com informações do potencial larvicida da espécie, no sentido de controle do vetor da dengue.

Na pesquisa de Anjana e Thoppil (2012) para o controle larvicida do *Aedes albopictus* Skuse a espécie apresentou considerável potencial larvicida com valores de CL_{50} 7,53 ppm. As diferenças na toxicidade dos óleos essenciais destas espécies contra *A. albopictus* foram devido variações quantitativas e qualitativas dos componentes. Pois, foi observada predominância dos compostos terpenóides na espécie, e o efeito potencial larvicida associada a presença majoritárias de sesquiterpenos. Desse modo, os resultados corroboram com os relatos em literatura da espécie para outros tipos de mosquito e a composição química, ressaltando a importância de desenvolvimento de trabalhos futuros com aplicação tecnológica alternativa de produtos naturais para o controle do vetor.

A espécie *H. crenata* apresentou atividade larvicida com CL_{50} de 89,4ppm, $p(\text{valor}) < 0,05$ significativo e coeficiente de determinação (R^2) de 0,5666. As informações da atividade larvicida da espécie contra larvas do mosquito *A. aegypti* são bastante escassas, foi

observado em diversos estudos à aplicação do óleo essencial para efeito repelente contra diversos tipos de mosquito.

Conforme em análise da composição química do óleo essencial, o composto majoritário foi 1,8-cineol (32,5%). Nesse contexto, esta pesquisa vem corroborando com a literatura, pois diversos autores atribuem o potencial repelente e larvicida desse monoterpeneo oxigenado (MAIA; ANDRADE, 2009; GOVINDARAJAN, 2011; LIMA et al., 2011).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos das propriedades químicas e biológicas realizadas nessa pesquisa puderam evidenciar o potencial de espécies da familiar Lamiaceae, no qual os óleos essenciais destas espécies se mostraram eficazes para a atividade antioxidante, controle bacteriano e larvicida. A composição química variada dos compostos presentes nos óleos essenciais dessas espécies é o principal fator relevante associado a atividades biológicas, diversas pesquisas direcionam e fundamentam para ação biológica isolada ou em conjunto (sinergismo) dos compostos majoritários.

A grande variabilidade na composição química dos óleos essenciais possivelmente deve-se às suas diferentes procedências, pois o conteúdo final de metabólitos secundários é influenciado por diversos fatores, como o local e o horário de coleta, processos de estabilização e condições de estocagem, sazonalidade e entre outros.

A atividade antioxidante pelo método de sequestro pelo DPPH do óleo essencial de espécies da família Lamiaceae, mostraram resultados positivos, considerando a relação entre concentração e valor de CI_{50} , apenas os óleos essenciais de *O. basilicum*, *M. piperita*, *M. pulgium* e *P. heyneanus* apresentaram potencialmente como bons agentes antioxidantes e possivelmente podem ser utilizados em fitoterápicos para o combate a doenças relacionadas ao radicais livres presentes no organismo humano.

Diversos bioensaios simples têm sido desenvolvidos no intuito de serem usados no monitoramento de extratos vegetais e óleos essenciais, dentre esses, destaca-se a toxicidade sobre *A. salina*, que é um bioensaio rápido e conveniente como estudo preliminar no monitoramento de espécies vegetais bioativas.

A diversidade dos compostos químicos identificados nos óleos essenciais de espécies da família Lamiaceae, influenciou diretamente na atividade citotóxica frente às larvas de *A. salina*. Desse modo, todos os óleos estudados apresentaram atividade tóxica, em maior parte os constituintes identificados foram hidrocarbonetos monoterpênicos e oxigenados, que apresentam relativa toxicidade segundo dados da literatura.

Nesse estudo as espécies de plantas da família Lamiaceae destacaram por apresentarem bioatividades relevantes, como potencial contra as bactérias. Desta forma, os resultados encontrados da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de espécies da família Lamiaceae podem contribuir significativamente na busca por substâncias mais eficazes com atividade contra bactérias frequentemente isoladas que causam problemas de saúde pública.

A alta taxa de mortalidade larval em baixas concentrações dos óleos essenciais de *O. gratissimum*, *O. basilicum*, *P. heyneanus* e *H. crenata* em larvas do *A. aegypti*, mostram o quanto é eficaz o controle do vetor a partir destes produtos vegetais, somado ao fato de que são espécies de plantas de fácil adaptação aos mais diversos ambientes, facilitando o cultivo para uma posterior extração e aplicação destes óleos essenciais em larvas do vetor da dengue, potencializando o controle ainda em sua forma imatura.

O estudo mais detalhado deve ser abordado para verificação do potencial larvicida e mecanismo de ação biológica, pois diversos autores afirmam que tanto extratos vegetais quanto os óleos essenciais em seus constituintes agem sobre o sistema nervoso do mosquito *Aedes aegypti* e esse mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado. As perspectivas apontam para a elaboração de novos ensaios usando amostras de menores concentrações, para verificação do grau de toxicidez em outras espécies animais, incluindo o homem, e elaboração de formulações, por exemplo, repelente que possam funcionar como uma alternativa natural ao combate e diminuição da incidência de dengue.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. **Allured Publishing Corporation**, 2012.
- ADEOLA, S. A. et al. Antioxidant and Antimicrobial Activities of the volatile oil of *Ocimum gratissimum* and its inhibition on Partially purified and characterized extracellular protease of *Salmonella enteritidis*. **American Journal of Drug Discovery and Developmente**, v. 4, n. 3, p. 180-193, 2014.
- ALCÂNTARA, J. M.; et al. Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán (Lauraceae). **Acta Amazônica**, v. 40, n. 3, p. 567-572, 2010.
- ALMEIDA, A. C. Potencial antimicrobiano dos óleos essenciais de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) e alfavacão (*Ocimum gratissimum* L.) em carne moída de ovinos contaminada experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Ciências Veterinária**, v. 20, n. 4, p. 248-251, 2013.
- ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e Antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- ARAÚJO, M. G. F.; et al. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (*Solanaceae*). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 205-209, 2010.
- ARASHIRO, M. P. et al. Cultivo consorciado entre *Achillea millefolium* L. e *Rosmarinus officinalis* L. e seu efeito no rendimento do óleo essencial, biomassa e atividade antimicrobiana pilates. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 3, p. 373-380, 2011.
- BARBOSA, F. F.; et al. Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N. E. BROWN. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1221-1225, 2006.
- BARETO, B. B. **Fitoterapia na Atenção Primária à Saúde – a visão dos profissionais envolvidos**. 2011. 93f. Dissertação. Programa de pós-graduação em saúde coletiva. Universidade Federal de Juiz de Fora. 2011.
- BENAYAD, N.; et al. Chemical characterization and insecticidal evaluation of the essential oil of *Mentha suaveolens* L. and *Mentha pulegium* L. growing in Morocco. **Index Copernicus Journal**, v. 13, n. 1, p. 27-32, 2012.
- BERTOLIN, D. C. et al. Aumento da produtividade de soja com a aplicação de bioestimulantes. **Bragantia**, v. 69, n. 2, p. 339-347, 2010.
- BERTINI, L. M.; et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v. 17, n. 3/4, p. 80-83, 2005.

BIMAKR, M.; et al. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, s/n., p. 67-72, 2011.

BIZZO, H. R.; et al. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BORA, K. S. et al. Role of *Ocimum basilicum* L. in prevention of ischemia and reperfusion-induced cerebral damage, and motor dysfunctions in mice brain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1360-1365, 2011.

BRAIDA, I.; MATTEA, M.; CARDARELLI, D. Extraction–adsorption–desorption process under supercritical condition as a method to concentrate antioxidants from natural sources. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 45, s/n., p. 195-199, 2008.

BRITO, J. P.; OLIVEIRA, J. E. M.; DE BORTOLI, S. A. Toxicidade de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). **Revista de biologia e ciências da terra**, v. 6, n. 1, p. 96-103, 2006.

CAVALCANTI, Y. W.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. Anti-adherent activity of *Rosmarinus officinalis* essential oil on *Candida albicans*: an SEM analysis. **Revista Odonto Ciência**, v. 26, n. 2, p. 139-144, 2011.

CHAUHAN, R. S.; et al. Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. accession [IIIM(J)26] from North-West Himalayan region, India. **Industrial Crops and Products**, v. 29, s/n., p. 654-656, 2009.

CONTI, B. et al. Essential oil composition and larvicidal activity of six Mediterranean aromatic plants against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 107, n. 6, p. 1455-1461, 2010.

COSTA, J. G. M.; et al. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.

COSTA, L. C. B.; et al. Qualidade fisiológica de sementes de *Ocimum selloi* benth. sob condições de luz, temperatura e tempo de armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 3, p. 675-680, 2010.

COUTINHO, I. D.; et al. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Guavira). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 4, p. 767-776, 2009.

DE FAZIO, J. L. ***Mentha piperita* L. cultivada com variação de cálcio. Trocas gasosas e óleo essencial**. 2011. 102p.. Tese (doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

DERWICH, E. et al. *In-vitro* Antioxidant Activity and GC/MS Studies on the Leaves of

Mentha piperita (Lamiaceae) from Morocco. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, v. 3, n. 2, p. 130-136, 2011.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd. Ed. United kingdom: John Wiley & Sons. 2009.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oil. **Journal of Applied Microbiology**. v.83, p.308-316, 2000.

EL HASSANI, F. Z. Use of olive mill wastewater as an organic amendment for *Mentha spicata* L. **Industrial Crops and Products**, v. 32, s/n., p. 343-348, 2010.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: **ANVISA**. 2010.

FERREIRA, V. B. N. **Estudo químico e avaliação do potencial antioxidante da *Equisetum arvense* e da *Marsypianthes chamaedrys***. 2001. 95 p. Dissertação (mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

FERRONATTO, R. et al. Atividade antioxidante dos óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* d.c. e *Baccharis uncinella* d.c. (asteraceae). **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v.10, n.2, 2006.

FERRONATTO, R.; et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n.2, p. 224-230, 2007.

GANDRA, E. A. Potencial antimicrobiano y antioxidante de extractos vegetales de romero, hinojo, estragón y orégano. **Revista de Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 20, p. 24-29, 2013.

GAUCH, L. M. R. Antifungal activity of *Rosmarinus officinalis* Linn. essential oil against *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis* and *Candida krusei*. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 5, n. 1, p. 61-66, 2014.

GENENA, A. K.; et al. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) – a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 463-469, 2008.

GOMES, S. P.; FAVERO, S. Avaliação de óleos essenciais de plantas aromáticas com atividade inseticida em *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera: Reduviidae). **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 33, n. 2, p. 147-151, 2011.

GOVINDARAJAN, M. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. **Parasitology Research**, v. 110, n. 5, p. 2023-2032, 2012.

HABER, L. L.; et al. Diferentes concentrações de solução nutritiva para o cultivo de *Mentha Piperita* e *Melissa officinalis*. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.4, p.1006-1009, 2005.

HAIDA, K. S. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar, Umuarama**. v.11, n.3, p.185-192. 2007.

HANAN, B. Evaluation of insecticidal activities of *Mentha piperita* and *Lavandula angustifolia* essential oils against house fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). **Journal of Entomology and Nematology**, v. 5, n. 4, p. 50-54, 2013.

HASSANPOURAGHDAM, M. B.; et al. New menthone type of *Mentha pulegium* L. volatile oil from northwest Iran. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 29, n. 3, p. 285-290, 2011.

HENTZ, S. M.; SANTIN, N. C. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) contra *Salmonella* sp. **Evidência**, v. 7, n. 2, p. 93-100, 2007.

HERRERO, M. et al. Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, s/n. p. 2512-2520, 2010.

HOLE, R. C. et al. Positive inotropic effect of the leaf extracts of parent and tissue culture plants of *Coleus amboinicus* on an isolated perfused frog heart preparation. **Food Chemistry**, v. 114, s/n., p. 139-141, 2009.

HUSSAIN, A.I. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 108, p. 986-995, 2008.

HUSSAIN, A. I. et al. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial Activities. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 1070-1078, 2010.

HUSSAIN, A.; ANWAR, F.; SHAHID, M. Chemical Composition, and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil of Spearmint (*Mentha spicata* L.) From Pakistan. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, p. 79-84, 2010.

IBGE. **Sinopse do Censo Demográfico 2010**. Rio de Janeiro, RJ: IBGE, 2011, 261p. ISBN-978-85-240-4187-7.

JESUS, W. M. M; CUNHA, T. N. Estudo das propriedades farmacológicas da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) e de duas espécies adulterantes. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v.-, n.1, p. 20-46, 2012.

KIEHLBAUCH, J. A.; et al. Use of the National Committee for Clinical Laboratory Standards Guidelines for Disk Diffusion Susceptibility Testing in New York State Laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3341-3348, 2000.

KPOVIESSI, B. G. K. et al. Chemical Variation of Essential Oil Constituents of *Ocimum gratissimum* L. from Benin, and Impact on Antimicrobial Properties and Toxicity against *Artemia salina* Leach. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, n. 1, p. 139-150, 2012.

KRUPPA, P. C; RUSSOMANNO, O. M. R. Ocorrência de fungos em sementes de plantas medicinais, aromáticas e condimentares da família Lamiaceae. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 1, p. 072-075, 2008.

KHUON, O. S. Pharmacological effect of aqueous leaves extract of *Ocimum basilicum* against liver toxicity induced by acetaminophen in male rats. **Thi-Qar University Journal for Agricultural Research**, v. 1, n. 1, p. 13-28, 2012.

KUMAR, S.; WAHAB, N.; WARIKOO, R. Bioefficacy of *Mentha piperita* essential oil against dengue fever mosquito *Aedes aegypti* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. 85-88, 2011.

LIMA, I. O.; et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

LIMA, R. K. et al. Chemical Composition and Fumegant Effect of Essential Oil of *Lippia sidoides* Cham. and monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L.) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE). **Ciência Agrotécnica: Larvas**, v. 35, n. 4, p. 664-671, 2011.

LINO, C. S.; et al. Evaluation of antinociceptive and antiinflammatory activities of the essential oil (EO) of *Ocimum micranthum* Willd. from northeastern Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 19, s/n., p. 708–712, 2005.

LISTON, M. S. Estudo da composição e aplicação do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. como agente antimicrobiano em Sururu (*Mytella falcata*). 2013. 73f. Dissertação. Universidade Federal da Maranhão- Centro de Ciências Exatas e Tecnologias. 2013.

LÔBO, K.M.S.; et al. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. e *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples, do semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.2, p.227-233, 2010.

LOPES, G. A. D. et al. Plantas medicinais: indicação popular de uso no tratamento de hipertensão arterial sistêmica (HAS). **Revista de Ciências Exatas**, v. 6, n. 2, p.143-155, 2010.

LORENZI, H. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. 2º ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. ISBN 85-86714-28-3

MALAQUIAS, G. et al. Utilização na medicina popular, potencial terapêutico e toxicidade em nível celular das plantas *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L. e *Mentha piperita* L. (Família Lamiaceae). **RevInter Revista Intertox de Toxicologia**, v. 7, n. 3, p. 50-68, 2014.

MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae - Aplicação em Produtos Alimentícios. **Brazil Journal Food Technology**., v. 10, n. 2, p. 96-103, 2007.

MAY, A.; et al. Produção de biomassa e óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em função da altura e intervalo entre cortes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n. 2, p.195-200, 2010.

MELO, J. G. M.; et al. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon*

citratus (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). **Acta Botânica Brasilica**, v. 21, n.1, p. 27-36, 2007.

MENSOR, L. L.; et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, s/n., p. 127-130, 2001.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 45, p. 31-34, 1982.

MG. BIOTA. **Boletim Técnico Científico da Diretoria de Biodiversidade do IEF – MG.**, v. 1, n.4 (2008) – Belo Horizonte: Instituto Estadual de Florestas, 2008.

MIRANDA, C. A. S. F. **Atividade antioxidante óleos essenciais de diversas plantas**. 2010. 153f. Dissertação. Universidade Federal de Lavras-Programa de Pós-graduação em Acroquímica, 2010.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. S4050-S4063, 2009.

MORAIS, S. M.; et al. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MOREIRA, M. D.; et al. Plant compounds insecticide activity against *Coleoptera* pests of stored products. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.42, n.7, p. 909-915, 2007.

MOTA, L. J. T. **Estudo químico e biológico das folhas e galhos de *Hyptis crenata* (Pohl) ex Benth (Lamiaceae - Lamiales)**. 2013. 63p. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade Federal do Amapá, Macapá. 2013.

MURUGAN, M. et al. Volatile oil composition of *Pogostemon heyneanus* and comparison of its composition with patchouli oil. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 12, p. 1961-4, 2010.

NASCIMENTO, J. E. et al. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 29, n.2, p. 145-150, 2008.

NADER, Talita Thomaz. **Potencial de atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais do cerrado frente estirpes de *Staphylococcus aureus***. 2010. 68f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências agrárias e Veterinárias, São Paulo, 2010.

NGUTA, J. M. et al. Biological screeig of keya medicinal plats usig *Artemia salina* L. (ARTEMIIDAE). **Pharmacology online**, v. 2, p. 458-478, 2011.

NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using the leaf extract of *Coleus amboinicus* Lour. **Materials Research Bulletin**, v.46, s/n., p. 1708-1713, 2011.

OLIVEIRA, A. S. C.; ZOGHBI, M. G. B.; CONCEIÇÃO, C. C. C. Produção de matéria seca e óleo essencial sob diferentes níveis de sombreamento de *Aeollanthus suaveolens* Mart. Ex Spreng. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA 12º: LIVRO DE RESUMOS, 2004, Belém, **Anais. PIBIC 03/04**. Belém: MPEG/MCT, 2004. p. 41-42.

OLIVEIRA, M. F.; et al. New enamine derivatives of lapachol and biological activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, n. 2, p. 211-221, 2002.

OLIVEIRA, R. A. G.; et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, p. 77-82, 2006.

PEGORARO, R. et al. Produção de óleos essenciais em plantas de *Mentha x piperita* L. var. *piperita* (Lamiaceae) submetidas a diferentes níveis de luz e nutrição do substrato. **Revista Brasileira de Botânica**, v.33, n.4, p. 631-637, 2010.

PEIXOTO, I.T.A. et al. Potential pharmacological and toxicological basis of the essential oil from *Mentha* spp. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 235-239, 2009.

PEREIRA, M. C. et al. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciênc. agrotec.**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n.4, p.146-152, 2012.

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

PESHEV, D.; et al. Application of organic solvent nanofiltration for concentration of antioxidant extracts of rosemary (*Rosmarinus officinallis* L.). **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, s/n, p. 318–327, 2011.

PRETTO, Juliana Bernardon. **Potencial Antimicrobiano de Extratos, Frações e Compostos Puros Obtidos de Algumas Plantas da Flora Catarinense**. 2005. p85. Dissertação (Mestrado). Universidade Vale do Itajaí, Santa Catarina, 2005.

PIMENTA, A. T. A.; et al. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvicida de *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 501-505, 2006.

PINHO, J. P. M. **Estudos das propriedades antiespasmódicas e miorrelaxantes do óleo essencial de *Ocimum micrathum* em traqueias isoladas de ratos wistar**. 2010. 89p. Dissertação (mestrado) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

PORTE, A.; GODOY, R. L. D. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim do CEPPA**, v. 19, n. 2, p. 193-210, 2001.

POTZERNHEIM, M. C. L.; BIZZO, H. R.; VIEIRA, R. F. Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 246-251, 2006.

RAVELLI, D. Estabilidade **oxidativa de óleo de soja adicionado de extratos de especiarias: correlação entre parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial**. 2011. 114f. Dissertação. Universidade de São Paulo-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

REBELO, M. M. et. al. Antioxidant capacity and biological activity of essential oil and methanol extract of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 230-235, jan./mar. 2009.

RICE, L. J.; et al. *Plectranthus*: A plant for the future? **South African Journal of Botany**, v. 77, s/n., p. 947-959, 2011.

RIBEIRO, D. S. **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) frente a bactérias isoladas de alimentos: estudos *in vitro* e em matriz alimentícia**. 2011. 102f. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. Universidade Federal da Bahia, 2011.

RIBEIRO, D. S.; et al. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 687-696, 2012.

RODRIGUES, E. Plants and animals utilized as medicines in the Jaú National Park (JNP), Brazilian Amazon. **Phytotherapy Research**, v. 20, s/n., p. 378–391, 2006.

RODRIGUES, M. R. A. **Estudos dos óleos essenciais presentes na manjerona e orégano**. 2002. 163 p. Tese (doutorado) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

ROSAS, J. F.; et al. Chemical composition of a methyl-(*E*)-cinnamate *Ocimum micranthum* Willd. from the Amazon. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, s/n., p. 161-163, 2005.

ROSAS, J. F.; et al. Comparação dos voláteis das folhas de *Ocimum micranthum* Willd. Obtidos por hidrodestilação e destilação-extração simultânea. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 26-29, 2004.

SACCHETTI, G.; et al. Composition and functional properties of the essential oil of Amazonian Brasil, *Ocimum micranthum* Willd., Labiatae in omparison with commercial essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3486-3491, 2004.

SANTOS, A. C. A.; et al. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 154-159, 2010.

SELVAKUMAR, P.; et al. Studies on the antidandruff activity of the essential oil of *Coleus amboinicus* and *Eucalyptus globulus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, s/v., s/n., p. S715-S719, 2012.

SHAHMOHAMEDI, R. et al. Antioxidant activity of Gilan *Mentha pulegium* during Growth. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 3, p. 380-387, 2014.

SHARAFI, S. M. et al. Protective effects of bioactive phytochemicals from *Mentha piperita* with multiple health potentials. *Pharmacognosy Magazine*, v. 6, n. 23, p. 147-153, 2010.

SHIRAZI, F. H.; AHMADI, N.; KAMALINEJAD, M. Evaluation of Northern Iran *Mentha pulegium* L. Cytotoxicity. **Daru**, v. 12, n. 3, p. 106-110, 2004.

SILVA, F. A. M. et al. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SILVA, D. M. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 143-145, 2007.

SILVA, L. L.; et al. Composição química, atividade antibacteriana *in vitro* e toxicidade em *Artemia salina* do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 700-705, 2010.

SILVA, M. G. V., et al. Essential oils of *Ocimum basilicum* L., *O. basilicum*. var. *minimum* L. and *O. basilicum*. var. *purpurascens* Benth. grown in north-eastern Brazil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, s/n., p. 13-14, 2003.

SILVA, M. S. A. et al. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus offi cinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 236-240, 2008.

SILVA, Q. J.; et al. Efeito do extrato de alecrim na estabilidade da polpa de acerola congelada. **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 4, p. 523-528, 2010.

SILVA, L. L. et al. Composição química, atividade antibacteriana *in vitro* e toxicidade em *Artemia salina* do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 700-705, 2010.

SILVA, R. B. L. **A etnobotânica de plantas medicinais da comunidade quilombola de Curiaú, Macapá-AP, Brasil**. 2002. 172 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2002.

SILVA, W. C.; et al. Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. **Acta Amazônica**, v. 37, n. 2, p. 293-298, 2007.

SILVERSTEIN, R. M; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7º ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. ISBN 978-85-216-1521-7

SIMÕES, C. M. O.; et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6º ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SINGH, G. et al. Studies on essential oils, Part 33: chemical and insecticidal investigations on leaf oil of *Coleus amboinicus* Lour. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, s/n., p. 440-442, 2002.

SOUZA, T. M. et al. Avaliação da atividade antisséptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n.1, p. 71-75, 2007.

SOUZA FILHO, A. P. S.; et al. Efeitos potencialmente alelopáticos dos óleos essenciais de *Piper hispidinervium* C. DC. e *Pogostemon heyneanus* Benth sobre plantas daninhas. **Acta Amazônica**, v. 39, n. 2, p. 389-396, 2009.

SOUZA JR. I. T.; SALES, N. L. P.; MARTINS, E. R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Biotemas**, v. 22, n. 3, p. 77-83, 2009.

SOUZA, S. A. M. et al. Óleos essenciais: aspectos econômicos e sustentáveis. **Enciclopédia Biosfera**, v.6, n.10, p. 1-11, 2010.

STEFFENS, A. H. **Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial**. 2010. 68f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. 2010.

STIEVEN, A. C.; MOREIRA, J. J. S.; SILVA, C. F. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. **Eclética Química**, v. 34, n. 3, p. 7-13, 2009.

TAVARES, L. A.; FERREIRA, A. G. Análises quali- e quantitativa de cafés comerciais via ressonância magnética nuclear. **Química Nova**, v. 29, N. 5, p. 911-915, 2006.

THANGAVEL, P.; et al. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of the valuable medicinal herb *Plectranthus barbatus* Andrews. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 43, p. 8562-8569, 2011.

VALGAS, C.; et al. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, s/n., p. 369-380, 2007.

VERBEL, J. O.; et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 568-574, 2010.

VERMA, R. S.; et al. Exploring compositional diversity in the essential oils of 34 *Ocimum* taxa from Indian flora. **Industrial Crops and Products**, v. 45, s/n., p. 7-19, 2013.

VIAN, M. A.; et al., Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. **Journal of Chromatography A**, v. 1190, s/n, p. 14-17, 2008.

VIEIRA, P. R. R. **Atividade antifúngica dos óleos essenciais de espécies de *Ocimum* frente a cepas de *Candida* spp. e *Microsporium canis***. 2009. 93f. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, 2009.

WHITEHORN, J.; FARRAR, J. Dengue. **British Medical Bulletin**, v. 95, s/n., p. 161-173, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. New edition, 2009. Geneva, (WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1).

_____. 1986a. **Dengue haemorrhagic fever control programme in Singapore : a case study on the successful control of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* using mainly environmental measures as a part of integrated vector control**.

_____. 1986b. **Dengue haemorrhagic fever : diagnosis, treatment, prevention and control**.

_____. 1984. **Report to the Regional Director: dengue virus vaccine development peer review meeting, Bangkok, 1-5 August 1983**.

ZABARAS, D.; WYLLIE, S. G. The effect of mechanical wounding on the composition of essential oil from *Ocimum Minimum* L. Leaves. **Molecules**, v. 6, s/n., p. 79-86, 2001.

ZAGO, J. A. A.; et al. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 828-833, 2009.

