

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Myristica fragrans*
Houtt. E DE *Salvia microphylla* H.B.K.:
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE
BIOLÓGICA E ANTIOXIDANTE**

RAFAELA KARIN DE LIMA

2008

RAFAELA KARIN DE LIMA

ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Myristica fragrans* Houtt. E DE *Salvia microphylla* H.B.K.: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE BIOLÓGICA E ANTIXIDANTE

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Agroquímica, para obtenção do título de “Doutor”.

Orientadora

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Lima, Rafaela Karin.

Óleos essenciais de *Myristica fragrans* Houtt. e de *Salvia microphylla*
H.B.K.: caracterização química, atividade biológica e antioxidante /
Rafaela Karin Lima. – Lavras : UFLA, 2008.

160 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Maria das Graças Cardoso.

Bibliografia.

1. Óleos essenciais. 2. Inseticida. 3. Bactericida. 4. Antioxidante. 5.
Condimento. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.88

RAFAELA KARIN DE LIMA

ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Myristica fragrans* Houtt. E DE *Salvia microphylla* H.B.K.: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE BIOLÓGICA E ANTIOXIDANTE

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Agroquímica, para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 12 de dezembro de 2008

Prof. Dr. Luís Roberto Batista	UFLA
Prof. Dr. Jair Campos de Moraes	UFLA
Prof. Dr. Ruy Carvalho	UFLA
Prof. Dr. Arie Fitzgerald Balnk	UFS
Prof. Dr. Alexandre Tourino Mendonça	UNINCOR

Profª. Dra. Maria das Graças Cardoso
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Aos meus pais, Sebastião e Mirian, considerados sempre, o meu maior exemplo de vida e de perseverança. Vocês serão eternamente a minha maior inspiração.

OFEREÇO

Aos meus irmãos, Igor Dudu e Leticia pela amizade, companheirismo e compreensão; ao meu amor Juninho pelo apoio e principalmente pela paciência.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, entusiasmo, inspiração e força para a realização deste projeto.

À professora Maria das Graças Cardoso, pela oportunidade e orientação. Sua compreensão, dedicação e amizade foram fundamentais; serei eternamente grata.

Ao professor Jair Campos Moraes, pela co-orientação, confiança, dedicação, atenção e principalmente pelos conhecimentos adquiridos na área de Entomologia.

Ao professor Luís Roberto Batista, pela co-orientação, consideração e atenção, sempre disponibilizando o Laboratório e materiais.

Ao professor Luis Cláudio de Almeida Barbosa, Coordenador do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos da UFV, pelas análises cromatográficas (CG-EM) dos óleos essenciais.

À professora Nilda Ferreira Soares, coordenadora do Laboratório de Embalagens da UFV, pelas cepas de bactérias concedidas.

Aos professores Evandro Afonso do Nascimento e Gláucia Guedes Santos Ladeira pelo incentivo desde o início dos meus estudos na área de Química.

A todos os professores do Departamento de Química, pela dedicação e conhecimentos transmitidos.

Às colegas e amigas Milene, Sara, Vanessa, Paula, Ana Elisa, Juliana, Cristiana e ao amigo e Bruno pelo companheirismo e colaboração na realização do experimento.

Aos colegas de Laboratório Luis Gustavo, Jean, Lidiany, Gisele, Juliana, Érica, Cleusa, Felipe, Ana, Leonardo, Wilder, Lucilene e Aline pela colaboração.

Ao Laboratório de Microbiologia, especialmente ao Victor, pelos ensinamentos e ajuda na realização do experimento com bactérias.

Aos funcionários do Departamento de Química.

Às secretárias Miriam, Lílian, Sirley e Xulita pela convivência e prestabilidade.

Aos colegas de pós-graduação Fabiane, Luciene, Annete, Maraísa, Ellen e Denise, pelo companheirismo.

À Irene, pela ajuda na realização dos experimentos no Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos (Departamento de Entomologia), pela amizade e carinho. “Se existissem mais pessoas como você o mundo seria bem melhor”.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Química, pela oportunidade concedida.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudo.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS.....	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Plantas condimentares	4
2.2 Metabólicos secundários	4
2.3 Óleos essenciais.....	5
2.3.1 Biossíntese de terpenóides.....	6
2.3.2 Biossíntese de fenilpropanóides	15
2.3.3 Técnicas de extração de óleos essenciais	16
2.3.3.1 Hidrodestilação.....	16
2.3.3.2 Destilação por arraste de vapor	16
2.3.3.3 Destilação com água-vapor	16
2.3.3.4 Extração com solvente orgânico.....	17
2.3.3.5 Extração por microondas.....	17
2.3.3.6 Presagem ou expressão.....	17
2.3.3.7 Extração por fluídos supercríticos.....	18
2.3.3.8 Microextração em fase sólida.....	18
2.3.3.9 Enfloração	18
2.3.4 Atividade biológica	18
2.3.4.1 Atividade bactericida.....	18
2.3.4.2 Atividade fungicida	20
2.3.4.3 Atividade inseticida	22
2.3.4.4 Atividade antioxidante	25
2.4 Melhoral (<i>Salvia microphylla</i> H.B.K.).....	28
2.5 Noz-moscada (<i>Myristica fragrans</i> Houtt.)	31
2.6 Óleos essenciais no controle de pragas	33
2.6.1 <i>Spodoptera frugiperda</i>	33
2.6.2 <i>Tenebrio molitor</i>	36

2.7 Óleos essenciais no controle de microrganismos	37
2.7.1 <i>Staphylococcus</i>	38
2.7.2 <i>Listeria</i>	39
2.7.3 <i>Escherichia</i>	39
2.7.4 <i>Salmonella</i>	40
2.7.5 <i>Aeromonas</i>	41
2.7.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
CAPITULO 1	56
Atividade bactericida e antioxidante de óleos essenciais de <i>Myristica fragrans</i> Houtt. e de <i>Salvia microphylla</i> H.B.K.....	56
1 RESUMO	57
2 ABSTRACT	59
3 INTRODUÇÃO.....	61
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	63
4.1 Extração do óleo essencial	63
4.2 Identificação e quantificação dos constituintes	64
4.3 Atividade bactericida (Método de Difusão Cavidade em Ágar)	64
4.4 Atividade antioxidante	66
4.4.1 Ensaio com DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila)	66
4.4.2 Ensaio com β -caroteno/ácido linoléico	67
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1 Óleos essenciais.....	69
5.2 Atividade bactericida.....	74
5.3 Atividade Antioxidante	80
6 CONCLUSÕES.....	85
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
CAPITULO 2	95
Atividade inseticida dos óleos essenciais de <i>Myristica fragrans</i> Houtt. e de <i>Salvia microphylla</i> H.B.K. em <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) e <i>Tenebrio molitor</i> L., 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae).....	95
1 RESUMO	96

2 ABSTRACT	98
3 INTRODUÇÃO.....	100
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	102
4.1 Extração dos óleos essenciais.....	102
4.2 Identificação e quantificação dos constituintes	102
4.3 Ensaio toxicológicos	103
4.3.1 Obtenção dos insetos	103
4.3.2 Ensaio de Deterrência em <i>S. frugiperda</i>	104
4.3.3 Ensaio de Aplicação Tópica em <i>S. frugiperda</i>	105
4.3.4 Ensaio de Fumigação em <i>T. molitor</i>	105
4.3.5 Ensaio de Repelência em <i>T. molitor</i>	106
4.3.6 Análise Estatística	107
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	108
5.1 Óleos essenciais.....	108
5.2 Ensaio toxicológicos	110
5.2.1 Ensaio de Deterrência e Aplicação Tópica em <i>S. frugiperda</i>	110
5.2.2 Ensaio de Fumigação e Repelência em <i>T. molitor</i>	117
6 CONCLUSÕES.....	124
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
ANEXOS.....	134

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

		Página
TABELA 1	Composição química do óleo essencial de sementes de <i>Myristica fragrans</i>	70
TABELA 2	Composição química do óleo essencial de folhas de <i>Salvia microphylla</i>	72
TABELA 3	Concentração mínima inibitória CMI ($\mu\text{g/mL}$), causada pelos óleos essenciais de <i>Myristica fragrans</i> e de <i>Salvia microphylla</i>	75
TABELA 4	Atividade antioxidante dos óleos essenciais de <i>Salvia microphylla</i> , <i>Myristica fragrans</i> e do Timol, pelos testes do DPPH e β -caroteno/ácido linoléico.....	81

CAPÍTULO 2

		Página
TABELA 1	Composição química do óleo essencial de sementes de <i>Myristica fragrans</i>	108
TABELA 2	Composição química do óleo essencial de folhas de <i>Salvia microphylla</i>	109
TABELA 3	Concentração de deterrência alimentar (CD_{50}) as 5 horas e intervalos de confiança (IC_{95}), para o ensaio de deterrência alimentar com folhas de milho tratadas com óleos essenciais de <i>Myristica fragrans</i> e de <i>Salvia microphylla</i> em lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	110
TABELA 4	Doses letais (DL_{50} e DL_{90}) as 24 e 48 horas e intervalos de confiança (IC_{95}), para o ensaio de aplicação tópica com óleos essenciais de <i>Myristica fragrans</i> e de <i>Salvia</i>	

	<i>microphylla</i> em lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	113
TABELA 5	Concentrações letais (CL ₅₀ e CL ₉₀) as 24, 48 e 72 horas e intervalos de confiança (IC ₉₅), para o ensaio de fumigação com os óleos essenciais de <i>Myristica fragrans</i> e de <i>Salvia microphylla</i> em adultos de <i>Tenbrio molitor</i>	117
TABELA 6	Porcentagem de repelência média (%PR) causada pelos óleos essenciais de <i>Myristica fragrans</i> e de <i>Salvia microphylla</i> em adultos de <i>Tenebrio molitor</i>	121

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1	Estrutura química do isopreno..... 06
FIGURA 2	Biossíntese de terpenos via mevalonato (Simões et al., 2004)..... 08
FIGURA 3	Biossíntese de terpenos via DXPS (Dewick, 2002)..... 09
FIGURA 4	Monoterpenos acíclicos (Dewick, 2002)..... 10
FIGURA 5	Formação de intermediários monoterpênicos (Dewick, 2002)..... 12
FIGURA 6	Monoterpenos monocíclicos (Dewick, 2002)..... 13
FIGURA 7	Monoterpenos bicíclicos (Dewick, 2002)..... 14
FIGURA 8	Biossíntese de fenilpropanóides (Simões et al., 2004)..... 15
FIGURA 9	Moléculas de carvacrol, miristicina e p-cimeno, respectivamente, atacadas por um radical livre (R•)..... 27
FIGURA 10	Aspecto geral da espécie melhoral (<i>Salvia microphylla</i> H.B.K.)..... 29
FIGURA 11	Estrutura química de alguns compostos encontrados em melhoral (<i>S. microphylla</i>)..... 30
FIGURA 12	Aspecto geral da semente de noz-moscada (<i>Myristica fragrans</i> Houtt.)..... 31
FIGURA 13	Aspecto geral da lagarta-do-cartucho do milho <i>Spodoptera frugiperda</i> 33
FIGURA 14	Aspecto geral de adultos de <i>Tenebrio molitor</i> 36

CAPÍTULO 1

	Página
FIGURA 1 Estruturas químicas alguns compostos presentes no óleo essencial de <i>Myristica fragrans</i>	71
FIGURA 2 Estruturas químicas dos constituintes majoritários encontrados no óleo essencial de <i>Salvia microphylla</i>	73

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

BHT	2,6-di(ter-butil)-p-cresol
BHA	2-ter-(butil-4)-metoxifenol
BHI	Caldo infusão de cérebro e coração
CG	Cromatografia em fase gasosa
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril- C _{oa}
DMAPP	Dimetilalilpirofosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DXPS	1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato
LPP	Linalilpirofosfato
GPP	trans-geranilpirofosfato
DPPH	1,1-difenil-2-picrilidrazila
NPP	cis-nerilpirofosfato
DIC	Detector por ionização de chamas
IPP	Isopentil-pirofosfato
W-M	Rearranjo de Wagner-Meerwein
MCI	Concentração Mínima Inibitória
FAL	Fenilalanina amonialiase
PCA	Plate count Agar
TSA	Tryptic soy Agar
ATP	Adenosina trifosfato
SECEX	Secretaria de Comércio Exterior
IOFI	International Organization of the Flavour Industry
IFRA	International Fragrance Association
ABIFRA	Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Essenciais:

Produtos Químicos Aromáticos, Fragrâncias, Aromas e Afins

ABECITRUS	Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
ATCC	American Type Culture Collection

RESUMO

LIMA, Rafaela Karin. **Óleos essenciais de *Myristica fragrans* Houtt. e de *Salvia microphylla* H.B.K.:** caracterização química, atividade biológica e antioxidante. 2008. 162 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Nos últimos anos, o interesse por “produtos naturais” na indústria de perfumes, alimentos e de defensivos têm estimulado a demanda do mercado mundial. Entre eles, os óleos essenciais vêm se destacando e sendo cada vez mais estudados para a substituição de compostos sintéticos, que apresentam toxicidade ao homem e ao meio ambiente. Diante do exposto, objetivou-se caracterizar os óleos essenciais de *Myristica fragrans* Houtt. e de *Salvia microphylla* H.B.K., bem como avaliar suas possíveis atividades antioxidantes, bactericidas e inseticidas. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação, empregando o aparelho de Clevenger modificado, sendo posteriormente, submetido, à análise por CG-EM e CG-DIC. Para avaliar a atividade bactericida, foi utilizado o método de difusão cavidade em ágar, para as bactérias *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Salmonella Choleraesuis* ATCC 6539, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Listeria innocua* ATCC 3309, e a atividade antioxidante, foi avaliada pelo teste do DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila) e β -caroteno/ácido linoléico. A atividade inseticida foi avaliada pelos testes de deterrência e de aplicação tópica sobre *Spodoptera frugiperda* e de repelência e fumigação sobre *Tenebrio molitor* (L.). Nas análises cromatográficas, foram encontrados como compostos majoritários no óleo essencial de *M. fragrans*, os monoterpenóides terpin-4-ol (14,95%), sabineno (13,07%), γ -terpineno (11,22%) e β -pineno (9,30%) e, em menores concentrações, os fenilpropanóides metil-eugenol (2,44%), miristicina (3,25%) e saffrol (1,92%), ao passo que, para o óleo essencial de *S. microphylla*, o (E)-cariofileno (15,35%), os sesquiterpenos alcoólicos α -eudesmol (14,06%), β -eudesmol (8,74%) e γ -eudesmol (7,64%). Os óleos essenciais apresentaram atividade bactericida sobre os microrganismos testados e antioxidante pelo teste β -caroteno/ácido linoléico. Nos testes em que se avaliou a atividade inseticida, verificou-se que os óleos essenciais apresentaram repelência e deterrência alimentar, causando mortalidade pelos testes de fumigação e a aplicação tópica para os insetos avaliados.

*Comitê Orientador: Maria das Graças Cardoso - UFLA (Orientadora), Jair Campos Moraes - UFLA e Luis Roberto Batista - UFLA (Co-orientadores)

ABSTRACT

LIMA, Rafaela Karin. **Essential oils of *Myristica fragrans* Houtt. and of *Salvia microphylla* H.B.K.:** chemical characterization, biological and antioxidant activity. 2008. 162 p. Thesis (Doctorate in Agrochemistry) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

In recent years the interest in "natural products" in the perfume industry, food and chemicals, has stimulated the demand of the world market. Among these, essential oils and has been emphasizing being increasingly studied for the replacement of synthetic compounds that show toxicity to humans and the environment. Facing the above, aimed to characterize the essential oils of *Myristica fragrans* Houtt. and of *Salvia microphylla* H.B.K. and also to assess their possible antioxidant activity, insecticide and bactericide. The essential oil was obtained by hydrodistillation, using the apparatus of Clevenger modified, and subsequently subjected to the analysis by GC-MS and GC-FID. To evaluate the bactericidal activity was used method by agar well diffusion, for the bacteria *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Salmonella Cholerasuis* ATCC 6539, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* 19117 and *Listeria innocua* ATCC 3309 and the antioxidant activity was evaluated using the DPPH (2,2-diphenylpicrylhydrazyl) and β -carotene/acid linoleic assay. Insecticidal activity was evaluated by the tests of feeding deterrence and topical application against *Spodoptera frugiperda* and repellency and fumigation against *Tenebrio molitor* (L.). In the chromatographic analysis were found as major compounds in the essential oil of *M. fragrans*, the monoterpenoids terpin-4-ol (14.95%), sabinene (13.07%), γ -terpinene (11.22%) and β -pinene (9.30%) and lower concentrations in the phenylpropanoids methyl-eugenol (2.44%), miristicin (3.25%) and safrole (1.92%), while for the essential oil of *S. microphylla* (E)-caryophyllene (15.35%), the oxygenated sesquiterpenes α -eudesmol (14.06%), β -eudesmol (8.74%) and γ -eudesmol (7.64%). The essential oils showed bactericidal activity on the microorganisms tested and the antioxidant activity for the β -carotene/acid linoleic assay. The tests that evaluated the insecticidal activity revealed that these oils are repellent and antifeeding and causing death by fumigation and topical application assay to the insects evaluated.

*Orienting Committee: Maria das Graças Cardoso – UFLA (Advisor), Jair Campos Moraes - UFLA and Luis Roberto Batista - UFLA (Co-advisor)

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os aromas e as fragrâncias estão cada vez mais presentes na indústria de cosméticos, alimentos e de fármacos. Sua obtenção pode ocorrer por fontes naturais, ou seja, diretamente de plantas, por meio de processos que utilizam microrganismos e células de plantas, ou sinteticamente em laboratório (Rozenbaum et al., 2006). Nos últimos anos, o interesse por esses “aromas naturais” estimulou a demanda do mercado internacional, movimentando aproximadamente 14 bilhões de dólares, em relação a perfumes, aromas e “flavor” de produtos alimentícios (Maróstica Júnior & Pastore, 2007; Bandoni & Czepak, 2008).

As indústrias de fragrâncias e aromas utilizam cerca de 700 matérias-primas (naturais e sintéticas), sendo aproximadamente 300 de origem vegetal, divididas em óleos essenciais, compostos isolados desses óleos (eugenol, anetol e citral) e produtos obtidos por semisíntese, como, iononas, terpineol e didromircenol. Assim, 85% do mercado mundial de fragrâncias e aromas são representados pelos óleos essenciais, tendo como principais os de laranja, limão, menta, citronela, cedro, espécies de eucalipto, lavandas, entre outros (Bandoni & Czepak, 2008).

O Brasil é um país rico em plantas, com importantes óleos essenciais que possuem compostos de grande interesse comercial, como o de sassafrás (*Ocotea odorífera*) (Lauraceae), pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) (Piperaceae) constituído principalmente de safrol (Fazolin et al., 2007). Dentre os óleos essenciais promissores, citam-se o alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) (Verbenaceae), candeeiro (*Vanillosmopsis arborea* Baker) (Asteraceae), priprioca (*Cyperus articulatus* L.) (Ciperáceae), laranja (*Citrus sinensis* L.) (Rutaceae) e de *Eucalyptus* sp.. A espécie *Eucalyptus citriodora* Hook

(Myrtaceae) é considerada a segunda principal produtora de óleo essencial, tendo como componente majoritário o citronelal, que varia entre 65-85% no óleo (Bandoni & Czepak, 2008).

No mercado nacional, o comércio de cosméticos que utiliza substâncias naturais tem aumentado o número de empregos, além dos altos investimentos em pesquisa, desenvolvimento e inovação. Entre essas indústrias, a que mais se destaca é a Natura; seu faturamento em 2004 foi de R\$ 2,5 bilhões (Loureiro, 2008). De acordo com a SECEX (Secretaria de Comércio Exterior), no ano de 2006, as exportações dos óleos essenciais chegaram a 31.110 toneladas, sendo a maior parte de laranja. Existem também associações, como a ABIFRA (Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Essenciais: Produtos Químicos Aromáticos, Fragrâncias, Aromas e afins), que promovem ações para o fortalecimento da indústria nacional, estabelecendo normas de controle de qualidade. A ABIFRA está associada a duas organizações internacionais: a IFRA (International Fragrance Association, 2007) e a IOFI (International Organization of the Flavour Industry, 2007).

Os óleos essenciais, bem como vários terpenos, estão sendo utilizados na agricultura contra fungos, bactérias, nematóides e insetos-pragas, e muitos desses compostos, como o timol, anetol, mentol e o 1,8 cineol, já fazem parte de várias formulações comercializadas. Sua importância está relacionada principalmente a sua biodegradabilidade, sendo esse um requisito de extrema importância, por oferecer maior segurança ao homem e ao meio ambiente (Isman, 2000; Isman, 2006).

Na indústria alimentícia, os óleos essenciais, além de conferirem aroma e sabor, possuem importantes atividades antioxidante e antimicrobiana, que podem potencializar o seu uso. Devido à importância crescente dos óleos essenciais no mercado mundial e à diversidade de espécies existentes, ainda inexploradas, são necessários, mais estudos que viabilizem o uso dessas plantas.

Assim, diante do exposto, objetivou-se caracterizar quimicamente os óleos essenciais de noz-moscada (*Myristica fragrans* Houtt) e de melhoral (*Salvia microphylla* H.B.K.), bem como avaliar suas possíveis atividades antioxidantes, bactericidas e inseticidas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas condimentares

As plantas aromáticas ou condimentares são utilizadas na culinária desde a antiguidade, sendo capazes de realçar o sabor dos alimentos. As principais espécies importadas pelos países europeus são hortelã, sálvia, orégano, manjerona, alecrim e louro, sendo os países em desenvolvimento, como o Brasil, responsáveis por mais de 50% da produção de óleos essenciais, o que se deve principalmente ao clima tropical e à mão-de-obra barata (Bandoni & Czepak, 2008).

Os óleos essenciais obtidos de plantas aromáticas e condimentares, além de realçarem o sabor dos alimentos, apresentam importantes atividades, como a antioxidante e a antimicrobiana, relatadas em inúmeros trabalhos. Entre esses, destacam-se o de salsa (*Petroselinum crispum*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), orégano (*Origanum vulgare*), louro (*Laurus nobilis*), manjerição (*Ocimum basilicum*), manjerona (*Manjorana hortensis*) e açafrão (*Curcuma longa*). Outros são utilizados na preparação de pratos doces, como o de noz-moscada (*Myristica fragrans*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), anis-estrelado (*Illicium verum*), erva-doce (*Foeniculum vulgare*) e o de gengibre (*Zingiber officinales*) (Tomaino et al., 2005; Lima & Cardoso, 2007).

2.2 Metabólicos secundários

As plantas possuem dois tipos de metabolismo: o “primário”, que se constitui na formação das principais macromoléculas, isto é, das proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos, sendo comuns em um organismo animal ou vegetal. O outro, “metabolismo secundário”, produz múltiplos

compostos que não são considerados essenciais, porém garantem vantagem para a sobrevivência da planta. Essas substâncias apresentam principalmente as funções de atração a insetos polinizadores e de defesa contra insetos-praga, fungos, bactérias e nematóides (Santos, 2004; Bakkali et al., 2008).

O metabolismo secundário dá origem aos compostos por meio de dois metabólicos intermediários que são derivados da glicose: o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico é precursor de taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcalóides derivados dos aminoácidos aromáticos e fenilpropanóides, compostos que têm em comum a presença de um anel aromático na sua constituição; ao passo que os derivados do acetato são aminoácidos alifáticos, e os alcalóides derivados dele, terpenóides, esteróides, ácidos graxos e triglicerídeos.

2.3 Óleos essenciais

Óleos essenciais são compostos voláteis caracterizados pelo forte odor, podendo ser obtidos de diversas partes de plantas por meio de várias técnicas, como a hidrodestilação, arraste a vapor, fluido supercrítico ou por prensagem de pericarpos de frutos cítricos. Apresentam normalmente de um a três compostos majoritários na sua constituição (20–70%), comparado com outros, que estão presentes em baixas concentrações (Dewick, 2002).

São produzidos no metabolismo secundário das plantas, variando a intensidade e a composição de acordo com a espécie, variabilidade genética, fatores ambientais, sendo geralmente específico para um determinado órgão e característico para o estágio de desenvolvimento da planta. Podem ser consideradas moléculas lipofílicas, de baixo peso molecular, constituídas de uma ou mais insaturações, instáveis à temperatura e à luz, podendo ser degradadas, ou sofrerem polimerização (Guimarães et al., 2008).

Dependendo da família, são encontrados em diferentes estruturas, como em pêlos glandulares (Lamiaceae), canais oleíferos (Apiaceae), bolsas lisígenas

ou esquisolisígenas (Pinaceae, Rutaceae) e células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae), podendo estar presentes em diferentes órgãos da planta, como flores, caules, raízes, frutos, folhas, entre outros (Simões et al., 2004; Bakkali et al., 2008).

Os constituintes dos óleos essenciais são agrupados em duas classes quimicamente distintas: terpenóides e fenilpropanóides (Robbers et al., 1997; Santos, 2004).

2.3.1 Biossíntese de terpenóides

Os terpenóides são constituídos de duas ou mais moléculas de isopreno (Figura 1), ocorrendo de forma mais abundante nas espécies produtoras de óleo essencial, sendo freqüentemente encontrados os monoterpenos, formados por duas moléculas de isopreno (cerca de 90% dos óleos essenciais) e os sesquiterpenos, formados por três moléculas de isopreno (Robbers et al., 1997).

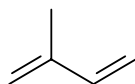


FIGURA 1. Estrutura química do isopreno

Os terpenóides são sintetizados no citoplasma via mevalonato. Esse é formado por condensação de uma unidade da acetoacetil-CoA com a acetil-CoA, seguida de uma hidrólise, formando o 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Em seguida, o HMG-CoA é reduzido por um processo que depende de NADPH e é catalisado pela HMGCoA-redutase a mevalonato que, por sua vez, é convertido em isopentenil-pirofosfato (IPP) e seu isômero dimetilalilpirofosfato (DMAPP) (Figura 2) (Simões et al., 2004).

Tem sido mostrado recentemente que a produção do IPP pode também ocorrer no cloroplasto (plastídios), pela via 1-deoxi-D-xilulose conhecida como via DXPS. Essa via inicia-se com a condensação de uma molécula de piruvato e outra D-gliceraldeído-3-fosfato, formando a 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato; após sucessivas reações, a molécula de IPP e de DMAPP são formadas (Figura 3). As moléculas de IPP e DMAPP formadas em ambas as vias condensam-se e originaram o trans-geranilpirofosfato (GPP), o qual é convertido nos diferentes monoterpenos. Devido à polimerização do trans-geranilpirofosfato com IPP, são formadas cadeias crescentes de cinco em cinco átomos de carbono, que dará origem aos monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos e assim por diante (Dewick, 2002).

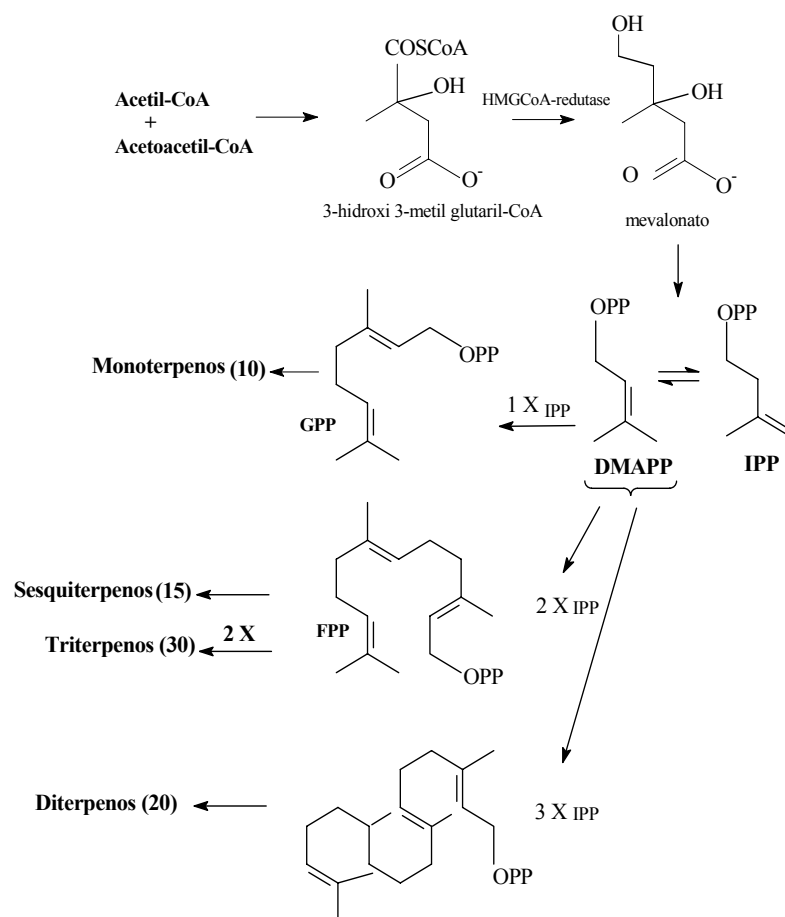


FIGURA 2. Biossíntese de terpenos via mevalonato (Simões et al., 2004)

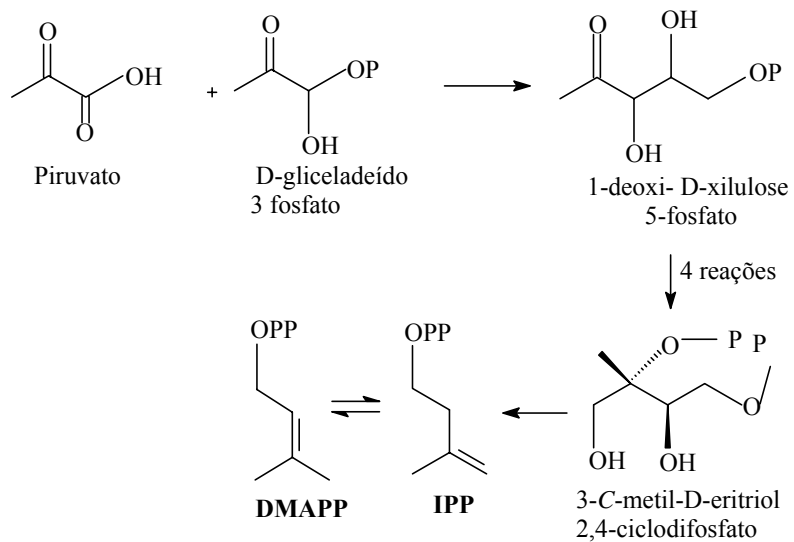


FIGURA 3. Biossíntese de terpenos via DXPS (Dewick, 2002)

Outros dois isômeros formados a partir do GPP são o linalilpirofosfato (LPP) (com mudança no grupo pirofosfato para um carbono terciário) e o cis-nerilpirofosfato (NPP), (formando um estereoisômero cis). Esses três compostos originam vários monoterpenos acíclicos, citados na Figura 4 (Dewick, 2002).

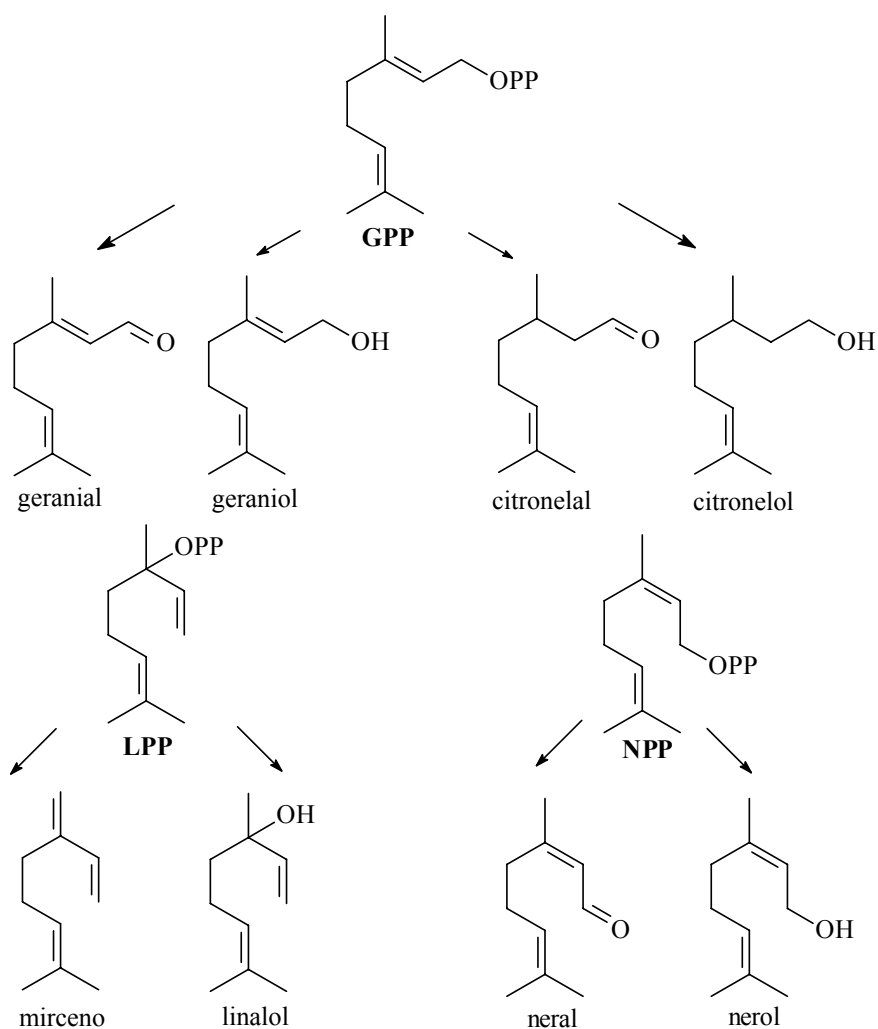


FIGURA 4. Monoterpenos acíclicos (Dewick, 2002)

Os monoterpenos monocíclicos, também conhecidos como mentanos, são formados por reações de ciclização, que envolvem a formação de vários intermediários, como do carbocátion mentil/ α -terpinil. Esse é formado a partir

do LPP, por rearranjo de Wagner-Meerwein (W-M), baseada na formação de um carbocátion mais estável (carbocátion terciário) (Figura 5) (Dewick, 2002).

O cátion mentil/ α -terpinil reagindo com uma molécula de água, dá origem ao α -terpineol, que, por sua vez, ciclizando, origina o 1,8 cineol, compostos presentes em vários óleos essenciais da família Lamiaceae. Com a perda de um próton H^+ , outro composto formado é o limoneno, um composto isomérico comumente encontrado nos óleos de *Citrus* spp., que, por ação de enzimas específicas, origina outros compostos oxigenados como mentol, isopiperitenol e a carvona encontrados em espécies de *Mentha*. O cátion terpine-4-il é formado pelo rearranjo W-M, com mudança de hidreto 1,2, que resulta na formação de um carbocátion terciário, originando os isômeros terpinenos. Com a uma nova deslocalização da dupla por este mesmo rearranjo, com mudança de hidreto 1,3, forma-se outro cátion alílico, o felandril, estabilizado por duas estruturas de ressonância, que permite a formação dos felandrenos (α e β) (Figura 6).

Os monoterpenos bicíclicos são formados pelo mesmo intermediário, mentil/ α -terpinil, e origina diferentes compostos, os quais são classificados como pinanos, fenchanos, boranos, tujanos e caranos, de acordo com seu esqueleto molecular (Figura 7) (Dewick, 2002).

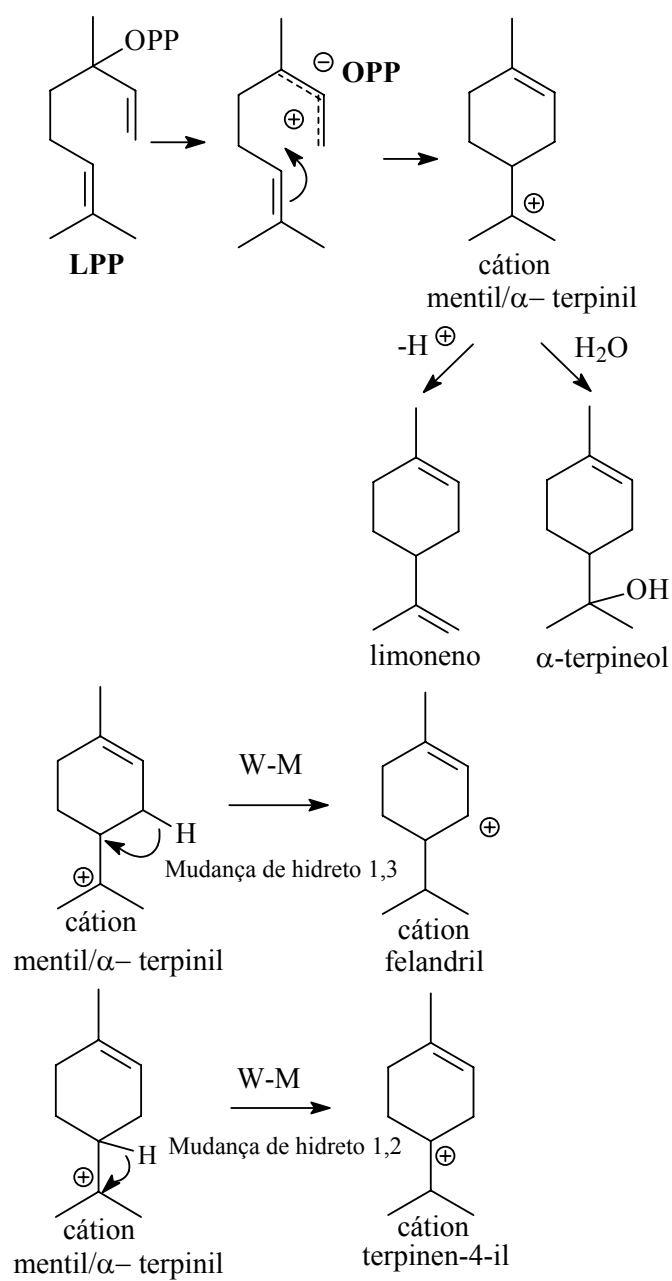


FIGURA 5. Formação de intermediários monoterpênicos (Dewick, 2002)

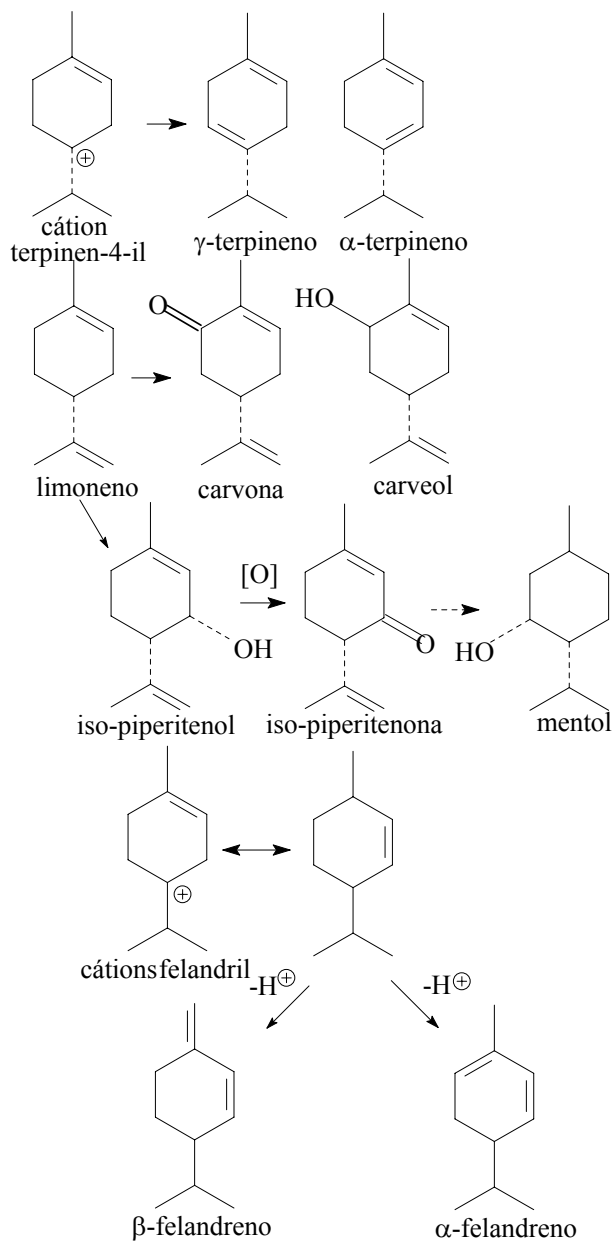


FIGURA 6. Monoterpenos monocíclicos (Dewick, 2002)

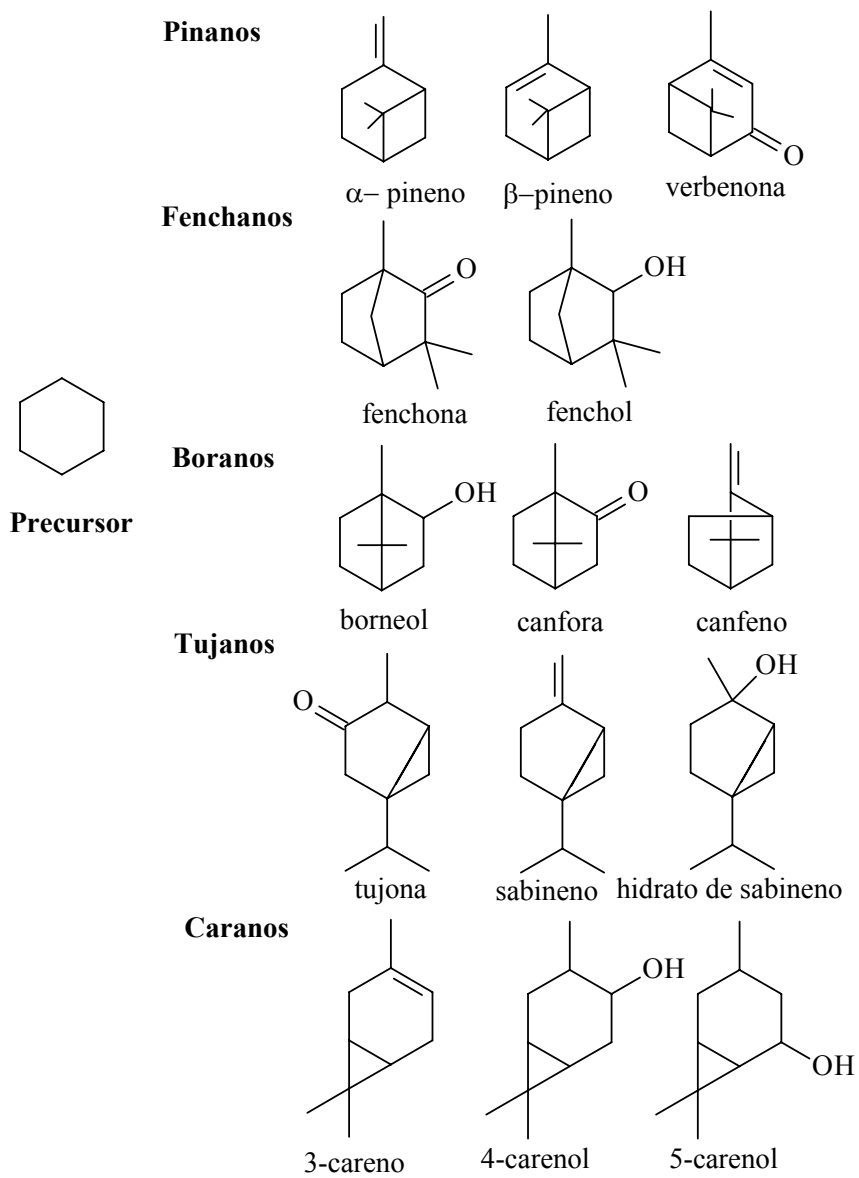


FIGURA 7. Monoterpenos bicíclicos (Dewick, 2002)

2.3.2 Biossíntese de fenilpropanóides

Os fenilpropanóides são derivados da rota que inicia com a formação do ácido chiquímico, dando origem à fenilalanina e à tirosina que, por sua vez, com a ação da enzima fenilalanina amonialiase (FAL), perde uma molécula de amônia, resultando na formação dos ácidos cinâmico e *p*-cumárico, respectivamente (Figura 8). Portanto, por meio de várias reações de redução, oxidação e ciclização, levam à formação de fenilpropanóides, tais como eugenol, metil-eugenol e aldeído cinâmico, entre outros (Simões et al., 2004).

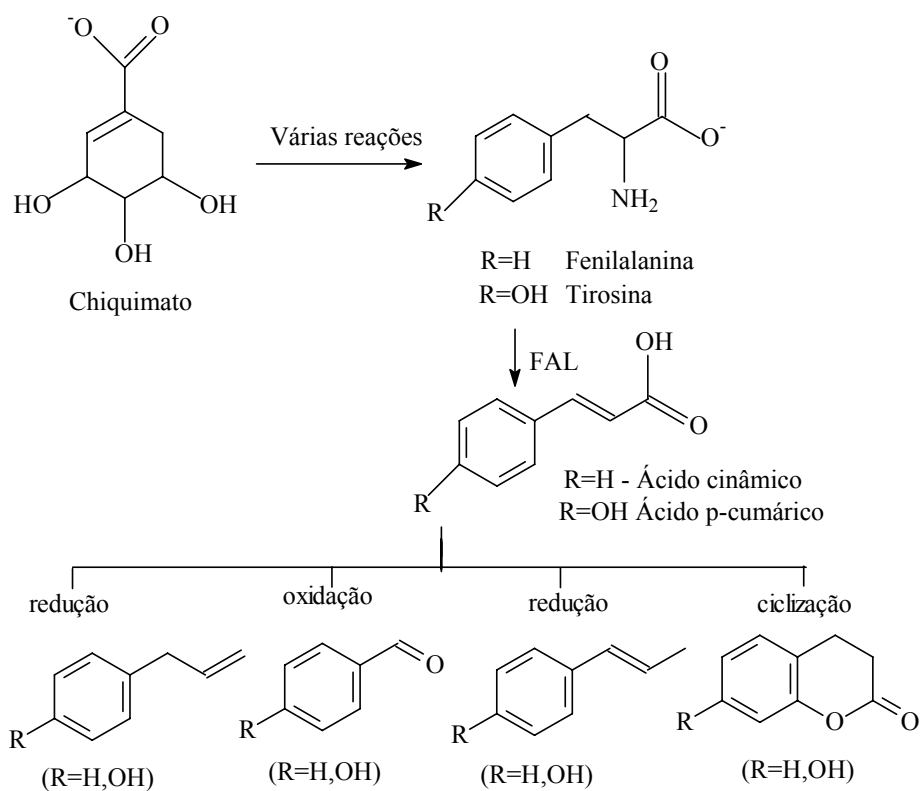


FIGURA 8. Biossíntese de fenilpropanóides (Simões et al., 2004)

2.3.3 Técnicas de extração de óleos essenciais

De acordo com a necessidade e o material disponível, várias técnicas de extração podem ser utilizadas, as quais estão sendo cada vez mais aperfeiçoadas e viabilizam a produção com uma determinada composição e pureza desejada.

2.3.3.1 Hidrodestilação

Para a obtenção dos óleos essenciais por hidrodestilação, o material vegetal entra em contacto com a água e, juntos, são levados à ebulição; os vapores gerados são condensados e o óleo essencial que é imiscível na água, é posteriormente separado. O equipamento recomendado para esse tipo de extração em escala laboratorial é o aparelho de Clevenger modificado (Simões et al., 2004; Bandoni & Czepak, 2008).

2.3.3.2 Destilação por arraste de vapor

É um dos processos mais antigos que garante a qualidade do óleo essencial, pois assegura que não haja o superaquecimento. No momento da extração, os vapores de água são gerados dentro de uma camisa que reveste o destilador; portanto, o calor dessa camisa aquece o material vegetal, diminuindo a quantidade de vapor necessário para chegar à temperatura em que ocorre o arraste do óleo essencial (Simões et al., 2004).

2.3.3.3 Destilação com água-vapor

Nesta técnica, a planta não entra em contacto com a água em ebulição, os vapores concentram-se em um compartimento separado e passam pelo material vegetal arrastando os componentes voláteis. Para minimizar os gastos, pode ser aplicado um sistema de coação, o qual envolve o retorno da água condensada (Bandoni & Czepak, 2008).

2.3.3.4 Extração com solvente orgânico

Não é recomendada, pois o óleo obtido é impuro devido à presença de ácidos graxos e outros compostos que são solúveis no solvente, necessitando de aquecimento para a separação (Simões et al., 2004).

2.3.3.5 Extração por microondas

O material vegetal fica imerso em um solvente transparente às microondas; assim com o aquecimento da água contida no vegetal, as estruturas celulares rompem-se e o óleo essencial fica dissolvido no meio com o solvente. A principal vantagem é a rapidez, comparada com as demais técnicas; todavia, as microondas são capazes de modificar os isômeros cis e trans, por causarem rotação nas moléculas (Bandoni & Czepak, 2008).

2.3.3.6 Presagem ou expressão

Neste processo, ocorre a dilaceração da epiderme e dos tricomas dos frutos cítricos inteiros ou das cascas; pode ser realizado de forma manual ou mecânica. Dependendo da quantidade de matéria-prima e da qualidade do óleo essencial desejado, escolhe-se o processo adequado. Durante esse processo de extração, compostos fotossensibilizantes, conhecidos como furanocumarinas são substâncias que absorvem fortemente energia na região do ultravioleta; por isso, são altamente reativas sob a incidência de luz. São extraídas junto com os óleos essenciais, as quais, em contato com a pele, causam queimadura pelo fato de reagirem com o DNA, RNA, proteínas e lipídios. Portanto, óleos essenciais cítricos obtidos por este processo não podem ser utilizados na indústria de cosméticos (Simões et al., 2004).

2.3.3.7 Extração por fluidos supercríticos

É um método bastante eficiente, tendo a vantagem de utilizar baixa temperatura e, ainda, por não existir resíduo de solventes. Podem ser utilizados para vários tipos de aromas, não somente para óleos essenciais (Simões et al., 2004).

2.3.3.8 Microextração em fase sólida

Outra técnica analítica importante para extração de óleos e substâncias voláteis é a microextração em fase sólida. Nesta técnica os componentes voláteis são depositados em uma agulha com material adsorvente e, em seguida, essa é inserida em um cromatógrafo gasoso, tendo como principal vantagem a pequena quantidade de material necessário para a análise (Sant'ana & Stein, 2001; Simões et al., 2004).

2.3.3.9 Enfloração

É um dos métodos mais antigos e atualmente utilizados por algumas indústrias de perfume, para a extração de óleos voláteis de pétalas de flores. Essas são depositadas sobre uma camada de gordura e substituídas por novas até que a gordura fique saturada. O óleo volátil é extraído com álcool e, em seguida, esse é destilado (Simões et al., 2004).

2.3.4 Atividade biológica

2.3.4.1 Atividade bactericida

Tem sido registrado atualmente um grande aumento no número de bactérias, que eram reconhecidamente sensíveis às drogas de rotina usadas em clínicas, mas que se apresentaram resistentes a quase todos os fármacos disponíveis no mercado. A *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, é uma

bactéria causadora de infecções hospitalares. Essa tem sido alvo de inúmeras pesquisas, devido à sua adaptação às condições adversas, desenvolvendo resistência durante a terapia (Arruda, 1998).

A resistência desses microrganismos patogênicos vem se tornando cada vez mais grave, devido às dificuldades para se descobrirem e de se lançarem novos antimicrobianos. Assim, esse problema tem contribuído durante décadas para estudos de novos compostos sintéticos e/ou naturais originados de plantas (Huycke et al., 1998; Cowan, 1999).

Na literatura existem vários relatos da atividade bactericida de óleos essenciais; contudo, poucos correlacionam essa atividade aos mecanismos de ação no microorganismo. Estudos de Barbel & Yashphe (1989), nos quais se avaliou o efeito do óleo essencial de *Achillea fragmentissima* em *Escherichia coli*, atribuíram que o óleo atua na membrana bacteriana, inibindo a respiração celular, reduzindo o conteúdo de ATP, além de facilitar a liberação de polipeptídeos e íons K⁺ para o meio. Segundo Carriconde et al. (1996), essa atividade deve-se principalmente à presença de terpenos, como, por exemplo, o citral (mistura de isômeros neral e geranial) encontrado no óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), considerado bactericida e fungicida.

Outros compostos importantes são o timol e o carvacrol. Eles vêm sendo largamente testados na preservação e inibição do crescimento de microrganismos encontrados em alimentos. Estudando a planta *Zataria multiflora*, Sharififar et al. (2007) constataram que a presença desses compostos foi responsável pela atividade bactericida sobre bactérias (Gram-negativas), bem como a atividade antioxidante encontrada para o seu óleo essencial. Segundo estes pesquisadores, o timol e o carvacrol apresentaram maior bioatividade sobre bactérias Gram-negativas devido à maior afinidade deste pela estrutura lipídica da membrana que as envolve. Em estudos anteriores de Burt (2004) sugeriu-se que as bactérias

Gram-negativas são em geral menos susceptíveis a ação dos óleos essenciais que as Gram-positivas.

A atividade do óleo essencial e de seus componentes majoritários pode variar quando esses compostos são avaliados separadamente. Vandra-Ünlü et al. (2003), estudando o óleo essencial de *Thymus pectinatus* (tomilho), constituído principalmente de timol, borneol γ -terpineno, ρ -cimeno e carvacrol, verificaram uma atividade antimicrobiana excelente para as frações do óleo essencial que continham o timol e carvacrol, e que os demais compostos poderiam estar agindo sinergisticamente com esses fenilpropanóides. No ano seguinte Burt (2004) relatou o sinergismo entre carvacrol e p -cimeno e entre cinamaldeído e eugenol.

Recentemente, Pereira et al. (2008) constaram em testes *in vitro* que os óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), orégano (*Origanum vulgare*) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) promoveram efeito inibitório sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 8739. Entretanto, quando avaliaram o efeito sinérgico dos óleos sobre as mesmas bactérias, não observaram diferenças significativas. Estudos realizados por Freire (2008) com as cepas dos mesmos microrganismos *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25992 constou a atividade bactericida para os óleos essenciais de anis-estrelado (*Illicium verum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e manjerona (*Origanum manjorona*). Entre os compostos majoritários encontrados para esses óleos estão o anetol, aldeído cinâmico e 4-terpineol, respectivamente.

2.3.4.2 Atividade fungicida

Na agricultura, os fungos são encontrados em grande diversidade e podem apresentar tanto aspectos positivos como negativos. São considerados maléficos, causando doenças e muitos prejuízos. Com o uso indiscriminado de

agrotóxicos, os danos ocasionados no ambiente têm levado ao desequilíbrio ambiental e a seleção de populações de fungos resistentes aos fungicidas tradicionais. Com isso, os produtos derivados de plantas estão sendo cada vez mais requisitados, por apresentarem baixa toxicidade ao homem e ao meio ambiente (Bergamim-Filho et al., 1995).

Inúmeros estudos com óleos essenciais demonstraram sua eficácia diante de fitopatógenos. Trabalhando com três espécies de eucalipto, Salgado et al. (2003) caracterizaram quimicamente e avaliaram a atividade fungicida dos óleos essenciais obtidos sobre os microrganismos *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. A maior atividade foi encontrada para a espécie *Eucalyptus urophylla*. Eles atribuíram a esse fato à presença do composto globulol, ausente no *E. camaldulensis* e no *E. citriodora*. Posteriormente, Santos et al. (2007), avaliando o óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), constituído principalmente de eugenol, encontraram alta atividade fungicida contra *F. oxysporum* e *Rhizoctonia solani*.

Atualmente, em alguns estudos, infere-se que a atividade de um óleo essencial pode variar de acordo com a metodologia utilizada. Recentemente Nascimento et al. (2008), estudando a atividade fungicida do óleo essencial de pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C. DC), sobre *Alternaria alternata*, constataram que ele apresentou efetivo no controle desse fitopatógeno e que o emulsificante Tween® 80, quando aplicado em diferentes concentrações, influenciou nessa atividade.

O mecanismo de ação dos compostos presentes nos óleos essenciais ainda não está bem esclarecido. Alguns autores, como Cowan (1999), sugerem que os terpenos são os compostos mais ativos contra bactérias, fungos e protozoários, agindo possivelmente na desorganização da estrutura de sua membrana.

As propriedades antimicrobianas de condimentos e óleos essenciais também podem ser importantes para a indústria alimentícia, pois podem promover efeito inibidor de fungos presentes em alimentos (Bertini et al., 2005). Estudando os óleos essenciais de canela, anis-estrelado e manjerona, Freire (2008) evidenciou o efeito inibitório desses óleos sobre os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Observou que a concentração mínima inibitória encontrada para o crescimento micelial do *A. parasiticus* foi de 1,00 e 0,01 µL/mL para os óleos de anis-estrelado e canela e, para o *A. parasiticus*, de 0,25; 2,00 e 2,00 µL/mL para os de canela, anis-estrelado e manjerona, respectivamente. Segundo o autor, os fungos do gênero *Aspergillus* são produtores de micotoxinas, produtos tóxicos que se desenvolvem sobre ou em produtos alimentícios de origem animal ou vegetal, que causam problemas à saúde humana.

Outros tipos de fungos importantes são aqueles causadores de micoses de pele e mucosas, como, por exemplo, os gêneros *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Zygomycetes* encontrados principalmente em grupos de pessoas com deficiência imunológica. Eles têm demonstrado resistência aos antimicóticos ultimamente utilizados (Krcmery & Barnesz, 2002). Estudando o óleo essencial de *Hyptis ovalifolia* Benth., conhecida como malva-do-cerrado, Oliveira et al. (2004) observaram que essa planta possui atividade fungicida satisfatória contra vários desses fungos dermatófitos, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Tricophyton mentagrophytes* e *Tricophyton rubrum*, com concentração inibitória mínima que varia de 125-7,8 µg/mL.

2.3.4.3 Atividade inseticida

Como os óleos essenciais são compostos voláteis oriundos de plantas, podem ser detectados por antenas ou tarsos de insetos. Entre esses compostos, estão os monoterpenos (citronelal, linalol, mentol, α e β -pinenos, mentona,

carvona e limoneno); sesquiterpenos (farnesol, nerolidol); fenilpropanóides (safrol, eugenol) e muitos outros compostos químicos (Panizzi & Parra, 1991; Simões et al., 2004).

A atividade inseticida de óleos essenciais pode ocorrer de diversas formas, causando mortalidade, deformações em diferentes estágios de desenvolvimento, como também repelência e deterrência, sendo a atividade repelente o modo de ação mais comum dos óleos essenciais e de seus componentes majoritários (Isman, 2006).

Em várias pesquisas tem sido comprovada a atividade repelente de óleos essenciais. De acordo com Harbone (1993), os monoterpenos α e β -pineno, presentes no óleo volátil extraído da resina de pinheiro (*Pinus sylvestris* L.), são armazenados pela larva da vespa *Neodiprion* (Hymenoptera), e utilizados pela ela, quando é atacada por um predador, causando repelência.

Machado et al. (1995), estudando o óleo essencial do louro (*Laurus nobilis* L.), verificaram que óleo essencial foi repelente a barata *Periplaneta americana* (L.) (Dictyoptera: Blattidae). Oliveira & Vendramim (1999), avaliando o óleo essencial de canela *Cinnamomum zeylanicum* L., que apresentaram como constituintes majoritários o eugenol e o aldeído cinâmico, observaram o efeito repelente sobre o caruncho-do-feijão *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae).

Vários efeitos são observados quando os óleos essenciais são aplicados sobre os insetos. De acordo com Hummelbrunner & Isman (2001), compostos presentes em óleos essenciais (terpenóides e fenilpropanóides) podem bloquear a octopamina, um neurotransmissor de insetos que possui funções similares da adrenalina em vertebrados. Isso foi evidenciado por Ngoh et al. (1998), que comprovaram a repelência, e a alta toxicidade por fumigação do safrol sobre *P. americana*. Concluíram que moléculas com as estruturas similares à do safrol e

isosafrol apresentam efeitos de neurotoxicidade, como convulsão, hiperatividade, agitação, tremores e paralisia.

A atividade deterrente alimentar, outra forma de ação dos óleos essenciais, foi evidenciada por Huang et al. (1999) para o safrol e o isosafrol, em pragas de grãos armazenados das espécies *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) e *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae), sendo observadas também a inibição para a enzima α -amilase in vivo. Anos depois, Harmatha & Nawrot (2002) relataram o mesmo efeito deterrente alimentar de vários fenilpropanóides e lactonas para os insetos *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae), *Tribolium confusum* (Duv.) (Coleoptera: Tenebrionidae) e *Trogoderma granarium* (Evert.) (Coleoptera: Dermestidae). Esses pesquisadores correlacionaram essa atividade com substituintes não-polares com grupos metoxilas e metilenodioxilas encontrados nesses compostos.

Cestari et al. (2004) avaliaram a atividade do óleo essencial de *Tagetes minuta* L. (Asteraceae), rico em (E)-nerolidol e (E)-anetol, no controle de piolhos *Pediculus humanus capitis* (L.) (Anoplura: Pediculidae). Observaram que esse mostrou-se tóxico e capaz de provocar um desarranjo nos filamentos de actina e miosina no exoesqueleto desse inseto.

O mentol, encontrado em plantas do gênero *Mentha*, é considerado um excelente inseticida, agindo como inibidor do crescimento de várias larvas (Agarwal et al., 2001). Os monoterpenóides fenólicos, timol e carvacrol, possuem atividade inseticida contra várias pragas de grãos armazenados, como o *S. zeamais* (Motsch.), *T. castaneum* (Herbst) e *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae), agindo principalmente por fumigação (Isman, 2000; Huang et al., 2002).

Os óleos essenciais de *Ocimum* sp. que são constituídos principalmente de metil-chavicol, trans-anetol, cis-anetol e eugenol, possuem atividade

inseticida comprovada por diversos autores. Paula et al. (2003), avaliando a atividade inseticida do óleo essencial da espécie *Ocimum selloi* Benth., verificaram que ele apresentou-se repelente para o mosquito *Anopheles braziliensis* Chagas (Diptera: Culicidae), transmissor de doenças como malária, dengue e febre amarela. Segundo os autores, esse óleo é extremamente promissor, por não apresentar risco mutagênico e de irritabilidade na pele humana.

Outros compostos presentes nos óleos essenciais podem ser atrativos a insetos polinizadores. Malerbo-Souza et al. (2003) demonstraram o efeito atrativo para o extrato capim-limão *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapfs, bem como dos compostos sintéticos eugenol, geraniol e citral, para abelhas *Apis mellifera* (L.) (Hymenoptera: Apidae).

Inúmeros outros compostos presentes nos óleos essenciais são considerados inseticidas, como o γ -terpineno, α -terpineno, linalol, metil-eugenol, eugenol, β -pineno, α -pineno, 1,8-cineol e citronelol. Contudo, vários estudos ainda são necessários para a aplicação de novos inseticidas orgânicos, a partir de produtos naturais, para se constatar a sua eficiência no controle de insetos-praga e a viabilidade econômica (Viegas Júnior, 2003; Sahin et al., 2004).

2.3.4.4 Atividade antioxidante

No organismo humano, são formados compostos que contêm um ou mais elétrons não pareados, conhecidos como radicais livres (R•). Entre as principais espécies de radicais livres, encontram-se o $^1\text{O}_2$ (oxigênio singlete), O_2^- (radical superóxido), OH^\bullet (radical hidroxila), NO^\bullet (óxido nítrico), ONOO^- (peroxinitrito) e Q^\bullet (radical semiquinona). São moléculas muito reativas, que causam danos oxidativos nas células e tecidos, os quais têm sido relacionados com a citologia de várias doenças, dentre aquelas degenerativas, como o câncer,

aterosclerose e cardiopatias, entre outras. O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes resulta em danos celulares, e é conhecido como estresse oxidativo. Assim, a utilização de elementos antioxidantes na alimentação e em bebidas pode ajudar a combater os radicais livres. Vários compostos presentes em plantas possuem essa atividade, como as vitaminas (α -tocoferol, β -caroteno, ácido ascórbico), clorofilina, curcumina, flavonóides e também alguns óleos essenciais (Bianchi & Antunes, 1999; Ruberto & Baratta, 2000).

Na alimentação, as plantas condimentares e seus derivados têm sido utilizados para preservação da oxidação de alimentos. Ozkan et al. (2007), pesquisando a atividade antioxidante do óleo essencial de *Satureja cíclica* (Lamiaceae) em margarina, constataram que esse óleo pode ser usado como antioxidante natural e aromatizante. Segundo eles, o processo de oxidação dos lipídeos presentes nos alimentos ocorre durante o processamento e a estocagem, devido à presença de instaurações na sua cadeia.

Devido à presença de compostos muito voláteis em alguns os óleos essenciais, durante o processamento de alimentos, eles podem volatilizar e sofrer modificações estruturais em suas moléculas, acarretando mudança na sua capacidade antioxidante. Tomaino et al. (2005), avaliando a capacidade antioxidante de óleos essenciais de cravo (*Eugenia caryophyllata*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), manjerição (*Ocimum basilicum*), orégano (*Origanum floribundum*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e noz-moscada (*Myristica fragrans*) em azeite de oliva, a uma temperatura de 180°C, durante 10 minutos, relataram que o óleo essencial de noz-moscada sofreu modificações na sua constituição e na sua capacidade antioxidante. Outro fator que deve ser levado em consideração é a matriz alimentícia em que os óleos essenciais estão inseridos, uma vez que esses compostos são instáveis, podendo ocorrer

oxidação, polimerização ou outro tipo de modificação estrutural (Bakkali et al., 2008).

Os compostos responsáveis pela atividade antioxidante conferida a alguns óleos essenciais são principalmente aqueles que possuem um ou mais grupos hidroxila (OH), ou metoxila (CH_3O) ligados ao anel aromático, instaurações e elétrons disponíveis para serem doados (Carvalho, 2004). O timol e o carvacrol, comumente encontrados em óleos essenciais do gênero *Tymus* e *Origanum* (Lamiaceae), são exemplos de terpenóides antioxidantes. Esses compostos apresentam caráter ácido, sendo, portanto, capazes de doar átomos de hidrogênio com um elétron desemparelhado ($\text{H}\cdot$), um radical que é estabilizado pelas estruturas de ressonância resultante da deslocalização dos elétrons na molécula, ocorrendo o mesmo para moléculas que apresentam grupos metoxila (CH_3O), como a miristicina (a), e insaturações, como o p-cimeno (b) (Figura 9).

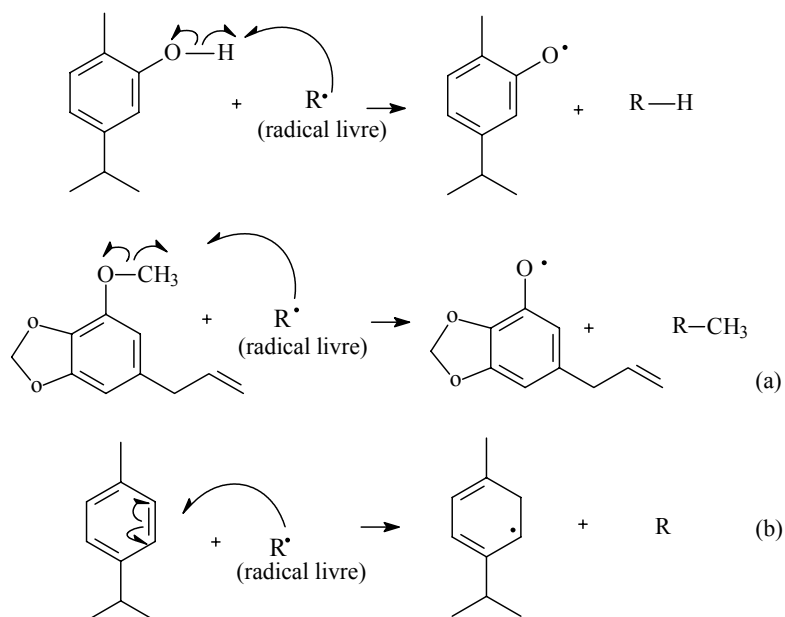


FIGURA 9. Moléculas de carvacrol, miristicina e p-cimeno, respectivamente, atacadas por um radical livre ($\text{R}\cdot$)

Outros compostos estudados que possuem atividade antioxidante são os fenilpropanóides, que apresentam em sua estrutura os grupos metoxila (CH₃O-) e hidroxila (-OH). Entre esses, citam-se o trans-anetol, safrol, apiol, eugenol e metil-eugenol. Por outro lado, os terpenos, como o α -pineno, β -pineno, γ -terpineno e p-cimeno, citados por Ruberto & Baratta (2000) e Zhang et al. (2006), apresentam baixa atividade, sendo, entretanto, capazes de aumentar a atividade ao agir sinergisticamente com outros compostos (Dorman et al., 1995).

No Brasil os óleos essenciais estão sendo cada vez mais estudados como agentes antioxidantes, porém, deve ser avaliada a preferência ou não preferência do óleo quando presente em um determinado alimento, já que haverá impacto também no seu sabor (Bertini et al., 2005; Morais et al., 2006; Ozkan et al., 2007).

2.4 Melhoral (*Salvia microphylla* H.B.K.)

As plantas da família Lamiaceae pertencem à ordem Tubiflorae Lamiales, abrangendo cerca de 200 gêneros e, aproximadamente, 3.200 espécies, distribuídas em todo o mundo. A maioria das espécies é conhecida pelo seu uso condimentar, e muitas delas possuem atividade biológica já relatada na literatura, por diversos autores (Lorenzi & Matos, 2002)

O gênero *Salvia* abrange aproximadamente 900 espécies. Algumas são utilizadas como flavorizante em perfumes, cosméticos e em alimentos (Kotan et al., 2008). Nos países da Europa, as espécies *S. officinalis* e *S. triloba* são as mais comercializadas, podendo ser utilizadas como condimento e chás. A espécie *Salvia officinalis* é economicamente a mais importante, principalmente pelo seu uso na culinária para temperar carnes, possuindo inúmeras propriedades medicinais, como espasmolítica, anti-séptica, adstringente. A maioria das espécies que possui atividade adstringente se deve à presença de taninos nas folhas (Newall et al., 1996; Tepe et al., 2005).

A espécie *Salvia microphylla* H.B.K, originária do México, é utilizada para o tratamento de dores, gripes, resfriados, problemas circulatórios e cardíacos (Figura 10) (Ritter et al., 2002). É conhecida popularmente como melhoral, podendo ser utilizada na culinária em pratos doces. Vários diterpenóides originados do ácido sandaracopimarico (1) foram isolados dessa espécie, sendo o mais abundante o ácido 7 α -hidroxisandaracopimaico (2), bem com seu derivado metil éster (3), e outros constituintes polares, como o 7 α -hidroxi-neo-clerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diolide (4) (Figura 11) (Esquivel et al., 1987). Posteriormente, esse último composto, juntamente com outros diterpenóides isolados de espécies de *Salvia*, apresentaram atividade deterrente alimentar para *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). (Simmonds et al., 1996).



FIGURA 10. Aspecto geral da espécie melhoral (*Salvia microphylla* H.B.K.)

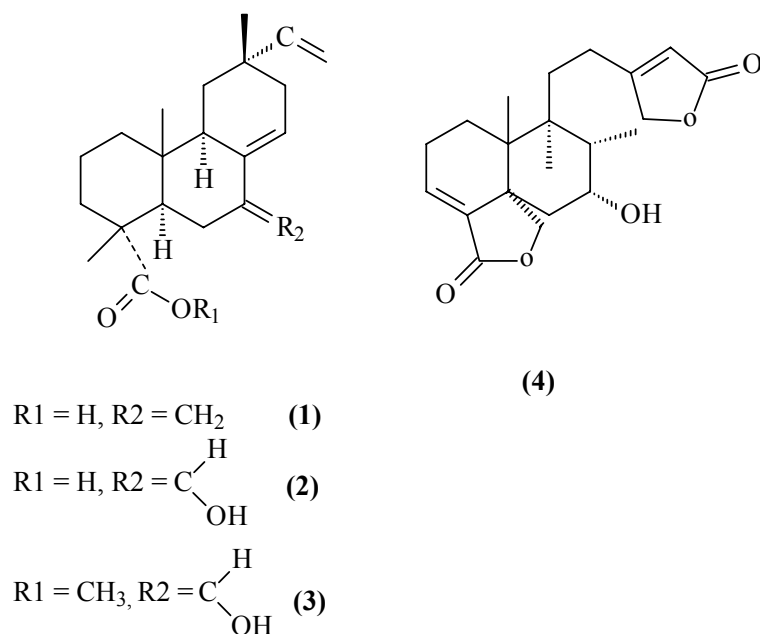


FIGURA 11. Estrutura química de alguns compostos encontrados em *S. microphylla*

Tepe et al. (2005) constaram que os constituintes do óleo essencial de *Salvia tomentosa* (Miller), coletada na Turquia, são o β -pineno (39,7%), α -pineno (10,9%) e cânfora (9,7%). Constataram, também, atividade bactericida e antioxidante com os testes do DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila) e do β -caroteno/ácido linoléico.

Tabanca et al. (2006) observaram que os principais constituintes do óleo essencial de *Salvia macrochlamys* e *Salvia recognita* foram o 1,8-cineol, borneol e cânfora, monoterpenos comumente encontrados em espécies desse gênero. Delamare et al. (2007) encontraram como constituinte majoritário do óleo essencial de *S. officinalis* o α -tujeno (24,8%), 1,8-cineol (14,85%), cânfora (10,9%), borneol (11,1%) e β -pineno (9,87%), enquanto que para a *S. triloba*, encontraram tujona (20,1%), 1,8-cineol (15,7%), cânfora (12,6%) e β -cariofileno

(11,8%). A atividade bactericida foi evidenciada para as espécies *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, com CMI de 0,50 e 0,30 mg/mL, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, com CMI de 5,0-10,0 e 0,23 mg/mL, respectivamente para ambos os óleos essenciais. Recentemente, Kotan et al. (2008), avaliando o óleo essencial de *Salvia hydrangea*, encontraram a cânfora (54,2%), α -humuleno (4,0%), hidrato de cis-sesquisabineno (2,8%), mirtenol (2,6%), β -bisabolol (2,2%) e 1,8-cineol (2.1%) como sendo seus principais constituintes, além de comprovarem sua atividade biológica em várias espécies de fungos, bactérias e insetos.

2.5 Noz-moscada (*Myristica fragrans* Houtt.)

A noz-moscada (*Myristica fragrans* Houtt.), pertencente à família Myristicaceae, é produzida no Sri Lanka, na Malásia e nas Antilhas. É uma árvore de 10 a 20 metros, com folhas ovais; o fruto tem formato oval como uma ameixa, quando maduro e a semente dá origem ao condimento noz-moscada (Figura 12) (Pelt, 2004). Essa é tradicionalmente utilizada na medicina devido a importantes atividades carminativas, antitrombóticas, antiinflamatórias e analgésicas (Skoglund & Jorkjend, 1991; Chung et al., 2006).



Fonte: <http://arundati.files.wordpress.com>

FIGURA 12. Aspecto geral da semente de noz-moscada (*Myristica fragrans* Houtt.)

Em sua constituição, o óleo essencial da semente está presente em torno de 5-15%, sendo encontrado compostos como o canfeno, elemicina, eugenol, isoelemicina, isoeugenol, metóxi-eugenol, pineno, sabineno, safrol, miristicina etc. (Choo et al., 1999; Maeda et al., 2008).

Possui também óleo fixo, compostos de ácido dihidroguaiarético, elemicina, ácido mirístico e lignanas (Isogai et al., 1973; Kuo, 1989).

Apresenta atividade antioxidante, evidenciada para seu óleo essencial pelo teste do ácido tiobarbitúrico e do DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila) (Dorman et al., 2000; Tomaino et al., 2005). Possui atividade bactericida contra inúmeras bactérias encontradas em carnes, como *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (Smith-Palmer et al., 1998).

Esse óleo essencial também apresentou atividade inseticida para diversas espécies de insetos. Huang et al. (1997) contaram seu efeito anti-alimentar para as pragas de grãos armazenados *T. castaneum* e *S. zeamais*. Recentemente, Jung et al. (2007), avaliando a atividade inseticida de alguns constituintes do extrato hexânico de *M. fragrans* contra as fêmeas adultas de *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae), constataram alta toxicidade dos compostos dentre monoterpenóides e fenilpropanóides. Observaram altos valores de toxicidade por contato em papel de filtro contaminado para (R)-(+)-β-pineno com DL₅₀ (0,06 mg/cm²), seguido da (R)-(+)-cânfora (0,1 mg/cm²) e (+)-α-terpineol (0,14 mg/cm²).

Chaubey (2008) verificou que o óleo essencial de *M. fragrans* afetou o desenvolvimento de larvas do besouro *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae). Em adultos ocasionou redução do número de ovos, bem como do potencial de oviposição e mortalidade pelo teste de fumigação.

Esses dois últimos efeitos foram evidenciados por Shukla et al. (2008), com a espécie *T. castaneum* e Park et al. (2008) demonstraram o efeito fumigante para larvas de *Lycoriella ingenua* (Dufour) (Diptera: Sciaridae).

2.6 Óleos essenciais no controle de pragas

2.6.1 *Spodoptera frugiperda*

Uma das pragas que mais se destacam na cultura do milho é a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797), pertencente à ordem Lepidoptera e família Noctuidae (Figura 13). Os adultos põem cerca de 2000 ovos na parte superior das folhas e, após três dias, as lagartas eclodem e passam a se alimentar das folhas mais novas, sendo a duração do período larval de 12 a 30 dias. Sua coloração é escura e, com o passar do tempo, apresentam faixa dorsal com pontos pretos (pináculos) na base das cerdas. A cabeça é preta com uma linha clara em forma de Y invertido, nitidamente perceptível. A mariposa mede aproximadamente 35 mm de envergadura, com as asas anteriores pardo-escuras e posteriores branco-acinzentadas (Gallo et al., 2002).



FIGURA 13. Aspecto geral da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda*

Considerada a principal praga do milho no Brasil, ataca plantas jovens e reduz em até 34% a produção, dependendo da idade da planta (Valicente & Cruz, 1991). O cultivo no período “safrinha” oferece boas condições para o desenvolvimento dessa praga, devido à permanência de plantas na mesma área durante o ano todo (Farias et al, 2001).

É comumente encontrada apenas uma lagarta desenvolvida por cartucho, devido ao canibalismo, podendo também encontrar lagartas de diferentes instares, porém, separadas por lâminas das folhas. O período pupal ocorre no solo, com duração de oito dias no verão e aproximadamente vinte e cinco dias no inverno, sendo as pupas de coloração avermelhada, medindo cerca de 15 mm de comprimento (Gallo et al., 2002).

Dentre os principais métodos de controle da lagarta-do-cartucho, está o controle biológico e o químico com o uso de inseticidas sintéticos (fosforados, carbamatos, piretróides, entre outros), os quais são tóxicos ao homem e ao meio ambiente. Atualmente têm sido utilizados inseticidas reguladores de crescimento, como o *Lufenuron*, que atuam na síntese de quitina, alterando o processo de ecdise (Grützmacher et al., 2000; Gallo et al., 2002).

Vários extratos de plantas e óleos essenciais já foram testados sobre a *S. frugiperda*. Roel et al. (2000) testaram extratos de folhas e ramos de *T. pallida* no alimento da lagarta no 1º instar e constataram que todos apresentaram atividade tóxica, sendo maior para o extrato acetônico em relação ao metanólico, acetato de etila e hexânico.

Posteriormente, Viana & Prates (2003), analisando o efeito do extrato aquoso de folhas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.), constataram que quando as folhas de milho eram pulverizadas ou submergidas no extrato de nim, causava elevada mortalidade, cerca de 100%, ou então prejudicava o desenvolvimento

das lagartas. No mesmo ano, Góes et al. (2003) constataram que o extrato de nim foi o mais eficiente em relação a outros extratos vegetais.

Borgoni & Vendramim (2003, 2005), trabalhando com *Trichilia pallens* e *T. pallida*, observaram que os extratos aquosos das espécies, quando testados nas folhas de milho, apresentaram promissores para o controle da lagarta-do-cartucho do milho.

Saito et al. (2004), testando vários extratos etanólicos de plantas sobre a lagarta-do-cartucho, observaram que o extrato da leguminosa *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellf foi o mais ativo com relação à atividade deterrente alimentar. Posteriormente, outros extratos de plantas, como de *Myrtillocactus geometrizans*, *Lippia sidoides* Cham., *Ruta graveolens* L., *Mormodica charantia* L. e *Ricinus communis* L. apresentaram efeitos na biologia desse inseto, como na duração do período pupal, redução de postura, peso de pupa e lagartas (Céspedes et al., 2008; Santiago et al., 2008).

Estrela et al. (2005), pesquisando amidas análogas à piperina, com os grupos N-hexil, N-isopropil e N-isopentil ligados ao isopentil (3,4-metilenodioxifenil) amida, observaram que essas amidas causaram alta toxicidade sobre a lagarta *S. frugiperda*, provocando mortalidade e deformidades envolvidas em suas atividades vitais.

Alguns óleos essenciais já foram avaliados para lagarta *S. frugiperda*. O óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus* J.), rico em citronelal e citronelol, demonstrou ação inseticida e repelente (Labinas et al., 2002). Castro et al. (2006) verificaram a não-preferência de óleos essenciais de mil-folhas (*Achillea millefolium*), e de tomilho (*Thymus vulgaris*) apresentando como composto majoritário o germancreno-D e timol, respectivamente. Neste mesmo ano, Lima (2006) evidenciou o efeito repelente/deterrente para o óleo essencial de folhas de goiabeira *Psidium guajava* L. sobre esse inseto.

2.6.2 *Tenebrio molitor*

Na estocagem de produtos alimentícios, podem ocorrer problemas com a presença de insetos que reduzem a qualidade e quantidade desses produtos. Entre esses, o coleóptero *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera:Tenebrionidae) é uma espécie dentre muitas que pode ser encontrada (Figura 14), ataca alimentos originados de grãos, como farinhas, rações e macarrão, causando contaminação com seus fragmentos, resultando, assim, na perda e recusa desses produtos para comercialização (Garcia et al., 2003; Pinto Júnior, 2008).



FIGURA 14 Aspecto geral de adultos de *Tenebrio molitor*

O controle desses insetos pode ser realizado por fumigantes à base de brometo de metila (Brasil, 2005). Todavia, vários problemas têm sido observados para esses inseticidas, como a carga residual que geram e

persistência no meio ambiente, bem como sua toxicidade e destruição que causam na camada de ozônio e da estratosfera terrestre (Ghini et al., 2002).

A atividade inseticida de vários compostos secundários avaliados sobre *T. molitor*, foram de diferentes formas na sua biologia. A “Azadiractina”, um limonóide encontrado em nim (*Azadirachta indica* A. Juss.), ocasionou atraso na ecdise de larvas, enquanto que compostos benzofuranos derivados trans-cinâmicos causaram deficiência no desenvolvimento de larvas e pupas (Pascual et al., 1990; Carrizo et al., 1998).

Na classe dos terpenóides, foram avaliados os diterpenóides clerodanos que ocasionaram atividade deterrente alimentar (Enriz et al., 1994). Posteriormente, Garcia et al. (2003), avaliando a atividade inseticida sobre larvas *T. molitor*, constataram o efeito inseticida de alguns sesquiterpenos isolados da espécie *Tessaria absinthioides* e de derivados semi-sintéticos. Esses pesquisadores observaram que o ácido tessárico causou a maior porcentagem de mortalidade e o aldeído cóstico causou alta repelência.

Recentemente, Fazolin et al. (2007) demonstraram que os óleos essenciais das Piperáceas *Piper aduncum* L., *Piper hispidinervum* C. DC. e da Bignoniácea *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum apresentaram-se promissores para o controle *T. molitor*, em testes de contacto (superfície contaminada) e aplicação tópica.

2.7 Óleos essenciais no controle de microrganismos

Um grande número de doenças transmitidas por bactérias alimentares tem aumentado no mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, onde a segurança alimentar é precária. Assim, com a resistência adquirida por elas, o interesse por estudos sobre novos antibióticos passou a ser alvo de inúmeras pesquisas. Entre os principais patógenos originados de alimentos, citam-se os gêneros: *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Streptococcus*, *Clostridium*,

Vibrio, Brucella, Echerichia, Listeria, Yersinia, Staphylococcus, Bacillus, Aeromonas e Pleisionomas.

2.7.1 Staphylococcus

O gênero, *Staphylococcus* compreende as bactérias esféricas Gram-positivas, não formadoras de esporos, que geralmente se dispõem em cachos irregulares semelhantes a cachos de uva. A espécie *Staphylococcus aureus* produz uma grande patogenicidade e virulência, sendo a mais estudada a gastroenterite de origem alimentar. As intoxicações alimentares são causadas pelas enterotoxinas, proteínas de baixo peso molecular, sendo essas termoestáveis e resistentes à cocção ou enzimas proteolíticas (Forsythe, 2005).

S. aureus existem no ar, poeira, esgoto, água, leite e nos alimentos. Nos seres humanos e animais, colonizam principalmente a pele e as mucosas nasais, podendo ser encontrado em menor quantidade no trato gastrointestinal, vagina e axilas (Wertheim et al., 2005).

As intoxicações humanas são causadas pela ingestão de enterotoxinas produzidas nos alimentos por algumas linhagens. Provocam infecções, tais como pneumonia, endocardite, sinusite, artrite e infecções no trato urinário (Chambers, 2001).

Os sintomas são caracterizados por períodos curtos de incubação, em casos mais agudos podem prolongar até 3 dias. Náuseas, vômitos, dores abdominais e prostração são considerados os sintomas predominantes, embora a diarreia seja freqüentemente notificada, a recuperação ocorre de 1 a 2 dias. Esses sintomas podem variar dependendo da suscetibilidade individual à toxina, da quantidade de alimento contaminado ingerido, da quantidade de toxina presente no alimento e da saúde da pessoa. Portanto, alguns indivíduos podem não demonstrar todos os sintomas associados à enfermidade (Santos, 2004; Forsythe, 2005).

2.7.2 *Listeria*

Neste gênero, as bactérias são Gram-positivas, não formadoras de esporos, possuindo formato de bastonetes regulares ou pequenos com 0,4-0,5 X 0,5-2,0 µm com extremidades arredondadas, desenvolvendo em ampla faixa entre 0 e 42°C. São sensíveis ao calor, sendo a pasteurização suficiente para destruí-las (Forsythe, 2005).

O gênero *Listeria* possui seis espécies conhecidas: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*; *L. innocua*; *L. seeligeri* e *L. welshimeri* e *L. grayi*, que são caracterizadas por seus antígenos, determinando 17 sorovares, sendo *L. innocua* considerada uma variante não patogênica de *L. monocytogenes*, segundo a INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF (1996).

A *L. monocytogenes* é a que causa maior preocupação no que concerne a enfermidades causadas por alimentos. Essa é causadora de infecções oportunistas, infectando principalmente pessoas com o sistema imunológico alterado, como de mulheres grávidas, idosos e recém-nascidos, podendo causar septicemia, abortos e doenças do Sistema Nervoso Central (SNC) no homem e em animais domésticos e silvestres (Hofer et al., 2000; Forsythe, 2005).

Pode ser encontrada em vários alimentos como legumes e frutas, tanto crus como processados, queijos e leites, carnes cruas fermentadas, e também em peixes e frutos do mar. É considerada resistente a baixas temperaturas, desenvolvendo a 3°C e podendo multiplicar-se em alimentos refrigerados (ICMSF, 1996; Borges et al., 1999).

2.7.3 *Escherichia*

A *Escherichia coli* é um bacilo Gram-negativo, não-esporulado anaeróbico facultativo, capaz de fermentar a glicose, com produção de ácido e

gás. Pode ser móvel, dotado de flagelos peritríquicos ou imóveis. É um gênero com grande número de linhagens e pode ser encarado como possuidor de uma única espécie, na qual existem várias centenas de diferentes tipos antigênicos (Jay, 2005).

As linhagens de *Escherichia coli* consideradas patogênicas são agrupadas em seis classes, baseadas nos fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiológicas: EPEC (enteropatogênia clássica); EIEC (enteroinvasora); ETEC (enterotoxigênica); EHEC (entero-hemorrágica), DAEC (difusamente adesiva) e EAaggEC (enteroagrativa). Seus sintomas são caracterizados por diarreia, acompanhada de dores abdominais, vômitos e febre com duração de seis horas a três dias, com período de incubação que varia entre 17 e 72 horas (Forsythe, 2005).

2.7.4 Salmonella

As salmonelas são bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos. Existem mais de 2.324 diferentes sorovares no gênero *Salmonella*, produzindo muitas e variadas enfermidades identificadas de um grande número de hospedeiros distribuídos pelo mundo. A classificação baseada no estudo do DNA determina somente duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (ICMSF, 1996).

A espécie *enterica* possui seis subespécies (Enterica, Salamae, Arizonae, Diarizonae, Houtenae e Indica). A subespécie Enterica possui um grande número de sorovares (Paratyphi A, Typhimurium, Agona, Derby, Heidelberg, Paratyphi B, Cholerasuis, Infantis, Virchow, Dublin, Enteritidis, Typhi e Anatum) (Forsythe, 2005; Jay, 2005).

A *Salmonella enterica* causa gastroenterite, diarreia, dores adnominais, náusea, febre, calafrios e dores de cabeça. A febre tifóide é a mais grave de todas

as doenças causadas por salmonelas, incluindo *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* e *C*. (Kaku et al., 1995; Jay, 2005).

As salmonelas causam gastroenterite febril acompanhada, algumas vezes, por bacteremia. A doença é autolimitante, podendo ser severa nas crianças e nas pessoas mais velhas. As infecções humanas resultam da ingestão de produtos de origem animal, incluindo ovos, carne de frango, de carne suína e de carne bovina (ICMSF, 1996).

A *Salmonella Cholerasuis* é uma *Salmonella enterica* sorovar Cholerasuis, que faz parte dos sorovares adaptados ao hospedeiro neste caso a suínos. Essa espécie tem propensão de invadir a corrente sanguínea (bacteremia), causando febre alta e persistente, dor no tórax, calafrios, sudorese e vômito, e o estado pode ser passageiro ou crônico (ICMSF, 1996; Jay, 2005).

2.7.5 Aeromonas

O gênero *Aeromonas* compreende bactérias compostas por bacilos Gram-negativos, imóveis e móveis por flagelo polar. Estão amplamente distribuídas na natureza, principalmente nos ecossistemas aquáticos (Forsythe, 2005).

As formas móveis de *Aeromonas* estão relacionadas a diversas doenças no homem, como a diarreia autolimitante e até mesmo mais severas do tipo colérica. São agentes etiológicos de várias doenças, como infecções oculares, no trato urinário e respiratório, peritonite, meningite e septicemia (Janda & Abbott, 1998; Ojeda-Vargas, 2005).

A bactéria *A. hydrophyla* encontra-se principalmente em alimentos, como peixes e frutos do mar e também em carnes vermelhas de gado, porco e ovelha. É responsável por gastroenterites, doença do tipo colérica e disenteria caracterizada por liberação de fezes contendo sangue e muco. Quando liberada

na corrente sanguínea, pode causar infecção generalizada em pessoas com sistema imunológico deficiente (Gracey et al., 1982; Janda & Abbott, 1998).

2.7.6 *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo não fermentador, sendo considerado um dos mais prevalentes agentes de infecções hospitalares do mundo (Brito et al., 2003).

Em ambientes hospitalares, essa bactéria torna-se um agente infeccioso importante, o número de fatores de virulência é significativamente maior em cepas oriundas de isolados clínicos, quando comparados às cepas do meio ambiente, sendo a resistência a vários antimicrobianos um de seus maiores problemas (Arruda, 1998).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, M.; WALIA, S.; DRINGRA, S.; KHAMBAY, B.P.S. Insect growth inhibition, antifeedant and antifungal activity of compounds isolated/derived from *Zingiber officinale* Roscoe (ginger) rhizomes. **Pest Management Science**, Sussex, v. 57, n. 3, p. 289-300, Mar. 2001.

ARRUDA, E.A.G. Infecção hospitalar por *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistente: análise epidemiológica no HC-FMUSP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 31, n. 5, p. 5030504, set./out. 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS, PRODUTOS QUÍMICOS AROMÁTICOS, FRAGRÂNCIAS E AFINS. **Apresenta informações sobre a ABIFRA**. Disponível em: <<http://www.abifra.org.br>>. Acesso em: 04 out. 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE CÍTRICOS. **Apresenta informações sobre a ABECITRUS**. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br/subprodutos.br>>. Acesso em: 01 out. 2007.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.

BANDONI, A.L.; CZEPAK, M.P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores**. Vitória: EDUFES, 2008. 623 p.

BAREL, S.; YASHPHE, J. Effect of essential oil from *Achillea fragrantissima* on *Escherichia coli* cells. **Current Microbiology**, Oxford, v. 19, n. 6, p.337-341, Dec. 1989.

BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, 919 p.

BERTINI, L.M.; PEREIRA, A.F.; OLIVEIRA, C.L. del.; MENEZES, E.A.; MORAIS, S.M.; CUNHA, F.A.; CAVALCANTI, E.S.B. Perfil de sensibilidade

de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas da região do nordeste do Brasil. **Infarma**, Brasília, v.17, n. 3/4, p. 80-83, 2005.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BOGORNI, P.C; VENDRAMIM, J.D. Bioatividade de extratos aquosos de *Trichilia ssp.* sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 665-669, Oct./Dec. 2003.

BOGORNI, P.C.; VENDRAMIM, J.D. Efeito subletal de extratos aquosos de *Trichilia ssp.* sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34 n. 2, p. 311-317, Mar./Apr. 2005.

BORGES, M.F.; SIQUEIRA, R.S.; BITTENCOURT, A.M.; VANETTI, M.C.D.; GOMIDE, L.A.M. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in salami. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 362-364, Oct./Dec. 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria n.º 49, 25 de abr. 2005. Submete à consulta pública, por um prazo de 30 (trinta dias), o Projeto de Instrução Normativa que Aprova o Regulamento para Credenciamento de Empresas Públicas e Privadas para prestação de serviços de Tratamentos Quarentenários, Fitossanitários e Procedimentos no Trânsito Internacional de Vegetais, seus produtos e subprodutos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, v. 142, n. 58, 27 mar. 2005. Seção 1.

BRITO, D.V.D.; OLIVEIRA, E.J.; DARINI, A.L.C.; ABDALLAH, V.O.S.; GONTIJO-FILHO, P.P. Nosocomial outbreaks due to *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a neonatal intensive care unit (Nicu) of the Uberlândia Federal University Hospital. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 27-28, Jan./Mar. 2003.

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

CARRICONDE, C.; MORES, D.; FRITSCHEN, M. von; CARDOZO JÚNIOR., E.L. **Plantas medicinais e alimentícias**. Olinda: UFRPe - Centro Nordestino de Medicina Popular, 1996. v. 1.

CARRIZO, R.; SOSA, M.E.; FAVIER, L.S.; PENNA, F.; GUERREIRO, E.; GIORDANO, O.S.; TONN, C.E. Growth-inhibitory activities of benzofuran and chromene derivatives toward *Tenebrio molitor* L. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 61, n. 10, p. 1209-1211, Oct. 1998.

CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. 480 p.

CASTRO, D.P.; CARDOSO, M.G.; MORAES, J.C.; SANTOS, N.M.; BALIZA, D.P. Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatum v. 8, n. 4, p. 27-32, 2006.

CÉSPEDES, C.L.; SALAZAR, J.R.; MARTÍNEZ, M.; ARANDA, E. Insect growth regulatory effects of some extracts and sterols from *Myrtillocactus geometrizans* (Cactaceae) against *Spodoptera frugiperda* and *Tenebrio molitor*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 66, n. 20, p. 2481-2493, Oct. 2005.

CESTARI, I.M.; SARTI, S.J.; WAID, C.M.; BRANCO-JUNIOR, A.C. Evaluation on the potential insecticide activity of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil against the head louse *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 805-807, Nov./Dec. 2004.

CHAMBERS, H.F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 7, n. 2, p. 178-182, Mar./Apr. 2001.

CHAUBEY, M.K. Fumigant toxicity of essential oils from some common spices against Pulse Beetle, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Oleo Science**, Tokyo, v. 57, n. 3, p.1771-1179, 2008.

CHOO, L.C.; WONG, S.M.; LIEW, K.Y. Essential oil of nutmeg pericarp. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, n.13, p. 1954-1957, Oct. 1999.

CHUNG, J.Y.; CHOO, J.H.; LEE, M.H.; HWANG, J. Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragrans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine**, Jena, v. 13, n. 4, p. 261-266, 2006.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 4, p. 564-582, Oct. 1999.

DELAMARE, A.P.L.; MOSCHEN-PISTORELLO, I.T.; ARTICO, L.; ATTI-SERAFINI, L.; ECHEVERRIGARAY, S. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in south Brazil. **Food Chemistry**, Oxford, v. 100, n. 2, p. 603-608, 2007.

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

DORMAN, D.H.J., DEANS, S.G., NOBLE, R.C. Evaluation in vitro of plant essential oils as natural anti-oxidants. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 7, n. 6, p. 645-651, Nov./Dec. 1995.

DORMAN, D.H.J.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; STANLEY, G.D. *In vitro* evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 15, n. 1, p.12-16, 2000.

ENRIZ, R.D.; BALDONI, H.; JÁUREGUI, E.; SOSA, M.E.; TONN, C.E.; GIORDANO, O. Structure activity relationships of clerodane diterpenoids acting as antifeedant agents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, n. 12, p. 2958-2963, Dec. 1994.

ESQUIVEL, B.; CARDENAS, J.; RODRIGUEZ-HAHN, L. The diterpenoid constituents of *Salvia fulgens* and *Salvia microphylla*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 50, n. 4, p. 738-740, 1987.

ESTRELA, J.L.V.; GUEDES, R.N.C.; MALTHA, C.R.A.; MAGALHÃES, L.C.; FAZOLIN, M. Toxicidade de amidas análogas à piperina para *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Magistra**, Cruz das Almas, v. 17, n. 2, p. 69-75, 2005.

FARIAS, P.R.S.; BARBOSA, J.C.; BUSOLI, A.C. Amostragem sequencial com base na Lei de Taylor para levantamento de *Spodoptera frugiperda* na cultura do milho: nota. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 395-399, abr./jun. 2001.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; FAZOLIN, M.; CATANI, V.; ALÉCIO, M.R.; LIMA, M.S. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC. *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.)

Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* (L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n.1, p.113-120, jan./fev. 2007.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre,: Artmed, 2005. 424 p.

FREIRE, J.M. **Óleos essenciais de canela, manjerona e anis-estrelado: caracterização química e atividade biológica sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus***. 2008. 68 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. v. 10, 920 p.

GARCÍA, M.; SOSA, M.E.; DONADEL, O.J.; GIORDANO, O.S.; TONN, C.E. Effects of some sesquiterpenes on the stored-product insect *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, Mendoza, v. 62, n.3/4, p.17-26, 2003.

GHINI, R.; SCHOENMAKER, I.A.S.; BETTIOL, W. Solarização do solo e incorporação de fontes de matéria orgânica no controle de *Pythium* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 9, p. 1253-1261, set. 2002.

GÓES, G.B.; NERI, D.K.P.; CHAVES, J.W.N.; MARACAJÁ, P.B. Efeito de extratos vegetais no controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). **Caatinga**, Mossoró, v. 16, n. 1/2, p. 47-49, 2003.

GRACEY, M.; BURKE, V.; ROBINSON, J. *Aeromonas*-associated gastroenteritis. **The Lancet**, London, v. 320, n. 8311, p. 1304-1306, 1982.

GRÜTZMACHER, A.D.; MARTINS, J.F.S.; AZEVEDO, R.; GIOLO, F.P. Efeito de inseticidas e de tecnologias de aplicação no controle da lagarta-do-cartucho na cultura do milho no agroecossistema de várzea. **In: REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DO MILHO**, 45.; **REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DO SORGO**, 28., 2000, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2000. p. 567-573,

GUIMARÃES, L.G.L.; CARDOSO, M.G.; ZACARONI, L.M.; LIMA, R.K.; PIMENTEL, F.A.; MORAIS, A.R. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, 2008.

HARBONE, J.B. **Ecological biochemistry**. 4. ed. London: Academic, 1993.

HARMATHA, J.; NAWROT, J. Insect feeding deterrent activity of lignans and related phenylpropanoids with a methylenedioxyphenyl (piperonyl) structure moiety. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 104, n. 1, p. 51-60, July 2002.

HOFER, E.; RIBEIRO, R.; FEITOSA, D.P. Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, São Paulo, v. 95, n. 5, p. 615-620, 2000.

HUANG, Y.; HO, S.H.; KINI, M. Bioactivities of safrole and isosafrole on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 92, n. 3, p. 676-683, June 1999.

HUANG, Y.; HO, S.H.; LEE, H.C.; YAP, Y.L. Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 403-412, 2002.

HUANG, Y.; TAN, J.M.W.L.; KINI, R.M.; HO, S.H. Toxic and antifeedant action of nutmeg oil against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 289-298, Oct. 1997.

HUMMELBRUNNER, A.; ISMAN, M.B. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 2, p. 715-720, Feb. 2001.

HUYCKE, M. M.; SAHM, D.F.; GILMORE, M.S. Multiple-drug resistant Enterococci: The nature of the problem and the agenda for the future. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 4, n. 2, p. 239-249, Apr./June 1998.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS . **Microbiología de los alimentos:** características de los patógenos microbianos. Zaragoza: Acribia, 1996. 606 p.

ISMAN, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 51, p. 45-66, 2006.

ISMAN, M.B. Plant essential oil for pest and disease management. **Crop Protection**, Oxford, v. 19, n. 8/10, p. 603-608, Sept./Dec. 2000.

ISOGAI, A.; SUZUKI, A.; TAMURA, S. Structure of dimeric phenoxypropanoids from *Myristica fragrans*. **Agricultural & Biological Chemistry**, Tokyo, v. 37, n. 1. p. 193-194, Jan. 1973.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S.L. Evolving Concepts Regarding the Genus *Aeromonas*: An Expanding Panorama of Species, Disease Presentations, and Unanswered Questions. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 27, n. 2, p. 332-344, Aug. 1998.

JAY, J. M. **Microbiología de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JUNG, W.C.; JANG, Y.S.; HIEU, T.T.; LEE, C.K.; AHN, Y.J. Toxicity of *Myristica fragrans* seed compounds against *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 44, n. 3, p. 524-529, May 2007.

KAKU, M.; PERESI, J.T.M.; TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; BATISTA, A.B.; CASTANHEIRA, I.A.Z.; GARCIA, G.M.P.; GELLI, D.S. Outbreak of *Salmonella enteritidis* in northwest of S. Paulo State, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 127-13, abr. 1995.

KOTAN, R.; SABAN, K.; AHMET, C.; MEMIS, K.; YUSUF, K.; HAMDULLAH, K. Antimicrobial and insecticidal activities of essential oil isolated from Turkish *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 36, n. 5/6, p. 360-368, May/June 2008.

KRCMERY, V.; BARNES, A.J. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **Journal of Hospital Infection**, London, v. 50, n. 4, p. 243-260, Apr. 2002.

KUO, Y.H. Studies on several naturally occurring lignans. **Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi**, Beijing, v. 5, n. 11, p. 621-624, 1989.

LABINAS, M.A.; CROCOMO, W.B. Effect of java grass (*Cymbopogon winteranus*) essential oil on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1979) (Lepidoptera, Noctuidae). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 5, p.1401-1405, Sept./Oct. 2002.

LIMA, R.K. **Caracterização química e bioatividades do óleo essencial de folhas de goiabeira sobre a lagarta-do-cartucho do milho**. 2006. 56 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LIMA, R.K; CARDOSO, M.G. Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante. **Revista Fitos**, São Paulo, v. 3, n. 3, p.14-24, set. 2007

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

LOUREIRO, G. Cresce revenda de cosméticos como garantia de renda extra. **A Gazeta**, Caderno Economia n. 15, 2006. Disponível em: <<http://www.abevd.org.br>>. Acesso em: 07 out. 2008.

MACHADO, V.L.L.; PALMA, M.S.; OLIVEIRA, M. da C. Ação repelente de óleos essenciais da folha de louro (*Laurus nobilis* L.) em ninfas e adultos de *Periplaneta americana* (L.) (Blattaria: Blatitidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 13-20, abr. 1995.

MAEDA, A.; TANIMOTO, S.; ABE, T.; KAZAMA, S.; TANIZAWA, H.; NOMURA, M. Chemical constituents of *Myristica fragrans* Houttuyn seed and their physiological activities. **The Pharmaceutical Society of Japan**, Shibuya, v. 128, n. 1, p. 129-133, Jan. 2008.

MALERBO-SOUZA, D.T.; CHARLIER, A.; ROSSI, M.M.; PINTO, A.S.; COUTO, R.H.N. Métodos para atrair e repelir a abelha *Apis mellifera* (L.) em cultura de maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa* Deg.). **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 25, n. 1, p. 1-8, jan./mar. 2003.

MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 382-387, mar./abr. 2007.

MORAIS, S.M.; CATUNDA JÚNIOR, F.E.A.; SILVA, A.R.A.; MARTINS NETO, J.S.; RONDINA, R.; CARDOSO, J.H.L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 907-910, set./out. 2006.

NASCIMENTO, F.R.; CARDOSO, M.G; SOUZA, P.E.; LIMA, R.K.; SALGADO, A.P.S.P; GUIMARÃES, L.G.L. Efeito do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC) e do emulsificante Tween® 80 sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* (Fungi: Hyphomycetes). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 38, n.3, p. 503-508, set. 2008.

NEWALL, C.A.; ANDERSON, L.A.; PHILIPSON, J.D. **Herbal medicines: a guide for health-care professionals**. London: The Pharmaceutical, 1996. 231 p.

NGOH, S.P.; CHOO, L.; PANG, F.Y.; HUANG, Y.; KINI, M.R.; HO, S.H. Insecticidal and repellent properties of nine volatile constituents of essential oils against the American cockroach, *Periplaneta americana* (L.). **Pesticide Science**, Sussex, v. 54, n. 3, p. 261-268, Nov. 1998.

OJEDA-VARGAS, M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, M.A.; ALFONSO-RODRÍGUEZ, O.; MONZÓN-MORENO, C. Urinary tract infection caused by bacteria of the genus *Aeromonas*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 23, n. 3, p. 81-82, mar. 2005

OLIVEIRA, C.M.A; SILVA, M.R.R.; KATO, L.; SILVA, C.C.; FERREIRA, H.D.; SOUZA, L.K.H. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). **Journal Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 15, n. 5, p. 756-759, Sept./Oct. 2004.

OLIVEIRA, J.V.; VENDRAMIM, J.D. Repelência de óleos essenciais e pós vegetais sobre adultos de *Zabrotes subfasciatus* (Boh) (Coleóptera: Bruchidae) em sementes de feijoeiro. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 28, n. 3, p. 549-555, set. 1999.

OZKAN, G.; SIMSEK, B.; KULEASAN, H. Antioxidant activities of *Satureja ciclicica* essential oil in butter and *in vitro*. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 79, n. 4, p. 1391-1396, Apr. 2007.

PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. **Ecologia nutricional de insetos e suas aplicações no manejo de pragas**. São Paulo: Malone, 1991. 391 p.

- PAULA, J.P. de; GOMES-CARNEIRO, M.R.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Chemical composition, toxicity and mosquito repellency of *Ocimum selloi* oil. **Journal Ethnopharmacology**, Clare, v. 88, n. 2/3, p. 253-260, Oct. 2003.
- PARK, I.K.; KIM, J.N.; LEE, Y.S.; LEE, S.G.; AHN, Y.J.; SHIN, S.C. Toxicity of plant essential oils and their components against *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 101, n. 1, p. 139-144, Jan. 2008.
- PASCUAL, N.; MARCO, M. P.; BELLÉS, X. Azadirachtin induced imaginal moult deficiencies in *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 53-57, Feb. 1990.
- PELT, J.M. **Especiarias & ervas aromáticas: história, botânica e culinária**. Rio de Janeiro: Jorge Zahar, 2004. 223 p.
- PEREIRA, A.A.; CARDOSO, M.G.; ABREU, L.R.; MORAIS, A.R.; GUIMARÃES, L.G.L.; SALGADO, A.P.S.P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, maio/jun. 2008.
- PINTO JÚNIOR, A.R. eficiência de terra de diatomáceas no controle de algumas pragas de milho armazenado a granel. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia de Uruguaiana**, Uruguaiana, v. 15, n. 1, p. 61-70, 2008.
- RITTER, M.R.; SOBIERAJSKI, G.R.; SCHENKEL, E.P.; MENTZ, L.A. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.12, n. 2, p.51-62, jul/dez. 2002.
- ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e farmacobioteecnologia**. São Paulo, 1997. 372 p.
- ROEL, A.R.; VENDRAMIM, J.D.; FRIGHETTO, R.T.S.; FRIGHETTO, N. Atividade tóxica de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 799-808, dez. 2000.

ROZENBAUM, H.F.; PATITUCCI, M.L.; ANTUNES, O.A.C.; PEREIRA, JR.N. Production of aromas and fragrances through microbial oxidation of monoterpenes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 23, n. 3, p. 273-279, July/Sept. 2006.

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

SAHIN, F.; GULLUCE, M.; SOKMEN, A.; SOKMEN, M.; POLISSIOU, M.; AGAR, G.; OZER, H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. vulgare in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, Langford, v. 15, n. 7, p. 549-557, Oct. 2004.

SAITO, M.L.; POTT, A.; FERRAZ, J.M.G.; NASCIMENTO, R.S. Avaliação de plantas com atividade deterrente alimentar em *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) e *Anticarsia gemmatalis* Hubner. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2004.

SALGADO, A.P.S.P.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; SOUZA, J.A.; ABREU, C.M.P.; PINTO, J.E.B.P. Avaliação fungitóxica de óleos essenciais das folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinérea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 345-349, mar./abr. 2003.

SANT'ANA, J.; STEIN, K. Extração e identificação de substância bioativas de insetos. In: FERREIRA, J.T.B.; CORRÊA, A.G.; VIEIRA, P.C. **Produtos naturais no controle de insetos**. São Carlos: Ed. da UFSCar, 2001. v. 3, 176 p. (Série de Testos da Escola de Verão em Química)

SANTIAGO, G.P.; PÁDUA, L.H.M.; SILVA, P.R.R.; CARVALHO, E.M.S.; MAIA, C.B. Efeitos de extratos de plantas na biologia de *Spodoptera frugiperda* J. E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) mantida em dieta artificial. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 792-796, maio/jun. 2008.

SANTOS, A.L. **Comportamento do *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal fabricado com leite cru**. 2004. 54 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SANTOS, L.G.M.; CARDOSO, M.G.; LIMA, R.K.; SOUZA, P.E.; GUIMARÃES, L.G.L.; ANDRADE, M.A. Avaliação do potencial fungitóxico do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perry (Cravo-da-Índia). **Tecno-Lógica**, Santa Cruz do Sul, v. 11, n. 1, p. 11-14, jan./dez. 2007.

SHARIFIFAR, F.; MOSHAFI, M.H.; MANSOURI, S.H.; HHODASHENAS, M.; KHOSHNOODI, M. *In vitro* evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. **Food Control**, Oxford, v. 18, n. 7, p. 800-805, July 2007.

SHUKLA, J.; TRIPATHI, S.P.; CHAUBEY, M.K. Toxicity of *Myristica fragrans* and *Illicium verum* essential oils against flour beetle *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Environmental, Agricultural Food Chemistry**, Oxford, v. 7, n. 7, p. 3059-3064, July 2008.

SIMMONDS, M.S.J.; BLANEY, W.M.; ESQUIVEL, B.; RODRIGUEZ-HAHN, L. Effect of Clerodane-Type diterpenoids isolated from *Salvia* spp. on the feeding behaviour of *Spodoptera littoralis*. **Pesticide Science**, Sussex, v. 47, n. 1, p. 17-23, May 1996.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2004.

SKOGLUND, L.A.; JORKJEND, L. Postoperative pain experience after gingivectomies using different combinations of local anaesthetic agents and periodontal dressings. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 18, n. 3, p. 204-209, Mar. 1991.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 118-122, Feb. 1998.

TABANCA, N.; DEMIRCI, B.; BASER, K.H.; AYTAC, Z.; EKICI, M.; KHAN, S.I.; JACOB, M.R.; WEDGE, D.E. Chemical composition and antifungal activity of *Salvia macrochlamys* and *Salvia recognita* essential oils. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 54, n.18, p. 6593-6597, Sept. 2006.

TEPE, B.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; SOKMEN, M.; POLISSIOU, M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). **Food Chemistry**, Oxford, v. 90, n. 3, p. 333-340, 2005.

TOMAINO, A.; CIMINO, F.; ZIMBALATTI, V.; VENUTI, V.; SULFARO, V.; PASQUALE, A.; SAIJA, A. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. **Food Chemistry**, Oxford, v. 89, n. 4, p. 549-554, 2005.

VALICENTE, F H.; CRUZ, I. Controle biológico da lagarta – do – cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovírus. Sete Lagoas: Embrapa, 1991. 23 p. (EMBRAPA-CNPMS. Circular Técnica, n.15).

VIANA, P.A.; PRATES, H.T. Desenvolvimento e mortalidade larval de *Spodoptera frugiperda* em folhas de milho tratadas com extrato aquoso de folhas de *Azadirachta indica*. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 1, p. 69-74, 2003.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 390-400, maio/jun. 2003.

WERTHEIM, H.; MELLES, D.; VOS, M.; LEEUWEN, W. van; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H.; NOUWEN, J. The role of nasal carriage in infections. **The Lancet Infectious Diseases**, Amsterdam, v. 5, n. 12, p. 751-762, Dec. 2005.

ZHANG, H.; CHEN, F.; WAN, X.; YAO, H.Y. Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. **Food Research International**, Amsterdam, v. 39, n. 8, p. 833-839, 2006.

CAPITULO 1

Atividade bactericida e antioxidante de óleos essenciais de *Myristica fragrans* Houtt. e de *Salvia microphylla* H.B.K

1 RESUMO

LIMA, Rafaela Karin. Atividade bactericida e antioxidante de óleos essenciais de *Myristica fragrans* Houtt. e de *Salvia microphylla* H.B.K. In: _____. **Óleos essenciais de *Myristica fragrans* Houtt. e de *Salvia microphylla* H.B.K.:** caracterização química, atividade biológica e antioxidante. 2008. Cap. 1, p.56-93. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Nos últimos, anos o interesse por “aromas naturais” nas indústrias de perfumes e alimentos tem estimulado a demanda do mercado mundial. Os óleos essenciais estão se tornando uma alternativa contra processos oxidativos e têm se mostrado como promissores na atividade antimicrobiana de alimentos. As plantas condimentares, na sua maioria, apresentam óleos essenciais com importantes atividades que podem potencializar seu uso. Diante do exposto, objetivou-se caracterizar quimicamente os óleos essenciais de *Myristica fragrans* Houtt. e de *Salvia microphylla* H.B.K., bem como avaliar suas possíveis atividades antioxidante e bactericidas. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação, empregando-se o aparelho de Clevenger modificado e, posteriormente, submetido à análise por CG-EM e CG. Para avaliar a atividade bactericida, utilizou-se o método de difusão em ágar sobre as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas das espécies: *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Salmonella Choleraesuis* ATCC 6539, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Listeria innocua* ATCC 3309. A atividade antioxidante dos óleos essenciais foi testada pelos testes DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila) e β -caroteno/ácido linoléico. Nas análises cromatográficas, foram encontrados como constituintes majoritários, no óleo essencial de *M. fragrans*, os monoterpenóides terpin-4-ol (14,95%), sabineno (13,07%), γ -terpineno (11,22%) e β -pineno (9,30%) e, em menores concentrações os fenilpropanóides metil-eugenol (2,44%), miristicina (3,25%) e safrol (1,92%), enquanto que, no óleo essencial de *S. microphylla*, o (E)-cariofileno (15,35%), os sesquiterpenos alcoólicos α -eudesmol (14,06%), β -eudesmol (8,74%) e γ -eudesmol (7,64%). Ambos os óleos essenciais apresentaram atividade bactericida satisfatória para os microrganismos avaliados. O óleo essencial de *S. microphylla* apresentou menores valores de CMI (Concentração Mínima Inibitória) em relação ao óleo

*Comitê Orientador: Maria das Graças Cardoso - UFLA (Orientadora), Jair Campos Moraes - UFLA e Luis Roberto Batista - UFLA (Co-orientadores)

essencial de *M. fragrans*, para a maioria das bactérias. Observaram baixos valores de CMI (3,90-7,81 µg/mL) para bactérias do gênero *Listeria*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Salmonella Cholerasuis*, testadas com o óleo essencial de *S. microphylla* e para *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Salmonella Cholerasuis* ATCC 6539 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, quando testadas com o óleo essencial de *M. fragrans*. A atividade antioxidante foi evidenciada pelo teste β-caroteno/ácido linoléico para o óleo essencial de *M. fragrans*, com CI₅₀ 976 µg/mL, e para o óleo de *S. microphylla* com CI₅₀ 770 µg/mL.

2 ABSTRACT

LIMA, Rafaela Karin. Bactericidal and antioxidant activity of essential oils of *Myristica fragrans* Houtt. and *Salvia microphylla* H.B.K. In: _____. **Essential oils of *Myristica fragrans* Houtt. and of *Salvia microphylla* H.B.K.**: chemical characterization, biological and antioxidant activity. 2008. Cap. 1, p. 56-93. Thesis (Doctorate in Agrochemistry) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

In recent years, the interest in "natural flavors" in the perfume and food industries has stimulated the demand of the world market. The essential oils are becoming an alternative against oxidative processes and have been shown as promising in the antimicrobial activity of food. The plants condiments have for the most essential oils with important activities that can maximize its use. Facing the above, aimed to chemically characterize the essential oils of *Myristica fragrans* Houtt. and of *Salvia microphylla* H.B.K. and also to assess their possible antioxidant activity and bactericidal. The essential oil was obtained by hydrodistillation, using the apparatus of Clevenger modified, and subsequently subjected to the analysis by GC-MS and GC. To evaluate the bactericidal activity using the method by agar well diffusion on the bacteria Gram-negative and Gram-positive of species: *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Salmonella Cholerasuis* ATCC 6539, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 and *Listeria innocua* ATCC 3309. The antioxidant activity was evaluated using the DPPH (2,2-diphenylpicrylhydrazyl) and β -carotene/acid linoleic assay. In the chromatographic analysis, were found as major constituents for the essential oil of *M. fragrans*, the monoterpenoids terpin-4-ol (14.95%), sabinene (13.07%), γ -terpinene (11.22%) and β -pinene (9.30%) and lower concentrations the phenylpropanoids methyl -eugenol (2.44%), miristicin (3.25%) and saffrole (1.92%), while for the essential oil of *S. microphylla* (E)-caryophyllene (15.35%), the oxygenated sesquiterpenes α -eudesmol (14.06%), β -eudesmol (8,74%) and γ -eudesmol (7.64%). Both essential oils showed bactericidal activity satisfaction of the microorganisms evaluated. The essential oil of *S. microphylla* had lower values of MIC (Minimum Inhibitory Concentration) in relation to the essential oil of *M. fragrans*, for most this bacteria. There was low CMI (3.90-7.81 μ g/ml) for

*Orienting Committee: Maria das Graças Cardoso – UFLA (Advisor), Jair Campos Moraes - UFLA and Luis Roberto Batista - UFLA (Co-advisor)

bacteria of the genus *Listeria*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Salmonella* Cholerasuis, tested with the essential oil of *S. microphylla* and *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Salmonella* Cholerasuis ATCC 6539 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, when tested with the essential oil of *M. fragrans*. The antioxidant activity was evidenced by the β -carotene/acid linoleic assay for the essential oil of *M. fragrans*, with IC₅₀ 976 μ g/ml, and the oil *S. microphylla* with IC₅₀ 770 μ g/ml.

3 INTRODUÇÃO

A determinação da atividade biológica de plantas e de seus derivados é muito importante na área de produtos naturais. Os óleos essenciais estão sendo cada vez mais estudados como agentes antioxidantes, e também para o controle de microrganismos. São utilizados tanto na indústria de alimentos, como também na indústria farmacêutica e de cosméticos, conferindo a esses produtos, além da proteção contra o processo de oxidação e a deterioração pelos microrganismos, um sabor e odor peculiar de cada essência (Burt, 2004).

As plantas condimentares e seus derivados têm sido utilizados para preservação da oxidação de alimentos e também na alimentação para combater os radicais livres, compostos que contêm um ou mais elétrons não-pareados. São moléculas muito reativas, que causam danos oxidativos nas células e tecidos, os quais têm sido relacionados com a citologia de várias doenças, dentre aquelas degenerativas, como o câncer, aterosclerose e cardiopatias, entre outras. O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes resulta em danos celulares, e é conhecido como estresse oxidativo (Bianchi & Antunes, 1999).

A noz-moscada *Myristica fragrans* Houtt., pertencente à família Myristicaceae e produzida no Sri Lanka, na Malásia e nas Antilhas, é tradicionalmente utilizada na medicina devido a importantes atividades carminativas, anti-trombóticas, anti-inflamatórias e analgésicas (Skoglund & Jorkjend, 1991; Chung et al., 2006). Dentre os principais compostos encontrados no óleo essencial, citam-se: o canfeno, elemicina, eugenol, isoelemicina, isoeugenol, metil-eugenol, pineno, sabineno, safrol, miristicina etc. (Singh et al., 2006; Maeda et al., 2008). Essa planta possui também óleo fixo, compostos de ácido dihidroguaiaretico, elemicina, ácido mirístico e lignanas (Kuo, 1989; Isogai et al., 1973). Seu óleo essencial possui atividade antioxidante e

bactericida, para as bactérias, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (Smith-Palmer et al., 1998; Dorman et al., 2000; Tomaino et al., 2005). Apresenta também atividade inseticida para diversas espécies de insetos, tais como: *T. castaneum*, *S. zeamais*, *B. germanica*, *C. chinensis* e larvas de *L. ingenua* (Huang et al., 1997; Jung et al., 2007; Chaubey, 2008; Park et al., 2008).

A espécie *Salvia microphylla* H.B.K, (Lamiaceae), originária do México, é utilizada para o tratamento de dores, gripes, resfriados, para problemas de circulatórios e cardíacos. Conhecida popularmente como melhoral pode ser utilizada especialmente na culinária em pratos doces (Ritter et al., 2002). Vários diterpenóides originados do ácido sandaracopimárico foram isolados dessa espécie, sendo o mais abundante o ácido 7 α -hidroxisandaracopimárico, bem com seu derivado metil éster, e outros constituintes polares como o 7 α -hidroxi-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diolide (Esquivel et al., 1987). Posteriormente, esses últimos compostos, juntamente com outros diterpenóides isolados de espécies de *Salvia*, apresentaram atividade deterrente alimentar para *Spodoptera littoralis* (Simmonds et al., 1996).

Devido à importância dessas plantas, utilizadas como condimentos, e do seu potencial biológico torna-se necessário, mais estudos que viabilizem seus usos. Diante do exposto, objetivou-se caracterizar quimicamente os óleos essenciais de noz-moscada (*Myristica fragrans*) e de melhoral (*Salvia microphylla*), bem como avaliar suas possíveis atividades antioxidante e bactericida.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Extração do óleo essencial

As sementes de noz-moscada (*M. fragrans*) foram obtidos em estabelecimento comercial (Lavras-MG), no mês de fevereiro 2007, ao passo que, as folhas frescas de melhoral (*S. microphylla*) foram adquiridas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (MG), a uma latitude 21° 14' 43 sul e longitude 44° 59' 59 oeste, com altitude de 919 metros. Elas foram coletadas no período da manhã, em torno de 8 horas, no mês de junho 2007. A identificação botânica foi realizada no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, e sua exsicata encontra-se depositada no Herbário da UFLA (registro 23.014).

A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação, empregando-se o aparelho de Clevenger modificado, com duração de 2,5 horas, partindo de uma massa de 300,0 g de folhas frescas de melhoral e de 20,0 g de sementes trituradas de noz-moscada, sendo realizada em triplicata. O hidrolado obtido foi recolhido e particionado com diclorometano, separando-se a parte orgânica e aquosa. Descartou-se a fase aquosa, adicionando-se o sulfato de magnésio anidro à fase orgânica. Filtrou-se, e em seguida, levou-se a um rotaevaporador (BÜCHI ROTAVAPOR R114) para a obtenção do óleo essencial puro, o qual foi acondicionado em um frasco escuro e deixado sob refrigeração a 4 °C (Castro et al., 2006). Em paralelo foi realizado o teste de umidade, proporcionando o cálculo do rendimento dos óleos essenciais para a planta seca em (%) p/p (Pimentel et al., 2006).

4.2 Identificação e quantificação dos constituintes

Os óleos essenciais foram submetidos à cromatografia em fase gasosa, acoplada ao espectrômetro de massas, em equipamento SHIMADZU, modelo CG-17A, com detector seletivo de massa, modelo QP 5000. O equipamento foi operado nas seguintes condições: coluna cromatográfica utilizada foi do tipo capilar de sílica fundida, com fase ligada DB5, de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, utilizando hélio como gás carreador (1 mL/min). As temperaturas foram de 220°C no injetor e 240°C no detector. A temperatura do forno foi programada de 40 a 240°C, com acréscimo de 3°C a cada minuto. A identificação dos compostos foi feita por comparações dos espectros de massas, com os espectros existentes na biblioteca (Wiley 229) e pelo índice de Kovat's (Adams, 2001). A quantificação dos constituintes foi realizada utilizando um cromatógrafo gasoso SHIMADZU, modelo 17A, equipado com detector de ionização de chama de hidrogênio (DIC) e coluna capilar DB5, de 30 cm de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio (2,2 mL/min); a taxa split 1:10 e o volume injetado de 1µL. A temperatura inicial da coluna foi de 45 até 240°C, sendo programada para ter acréscimos de 3°C a cada min, até atingir a temperatura máxima de 240°C. As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 220 e 240°C, respectivamente, com a pressão da coluna de 115 KPa. Foram realizadas três injeções de cada óleo essencial, obtendo-se a concentração média e o desvio-padrão para cada constituinte, sendo a quantificação obtida por normalização de área (%).

4.3 Atividade bactericida (Método de Difusão Cavidade em Ágar)

Para a avaliação da atividade bactericida dos óleos essenciais, foram utilizadas as cepas puras de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, *Pseudomonas*

aeruginosa ATCC 15442, *Salmonella Cholerasuis* ATCC 6539, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Listeria innocua* ATCC 3309.

A contagem do número de unidades formadoras de colônias foi padronizada empregando-se a escala de McFarland, utilizando-se a concentração de inóculo de 10^7 UFC/mL. Para a ativação das culturas, alíquotas foram transferidas, para tubos de ensaio contendo o caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas por 24 horas a temperatura de 28°C para *A. hydrophyla* e 37°C para as demais culturas. Após este período, alíquotas foram novamente transferidas para caldo TSB (Tryptic Soy Broth) e novamente incubadas nas mesmas temperaturas, sendo monitorado de uma em uma hora o aumento do número de inóculos pelo espectrofotômetro (SHIMATZU UV-160 1PC) / 625 nm, de acordo com a escala de McFarland, até a concentração desejada. Paralelamente, realizou-se o plaqueamento em ágar TSA (Tryptic Soy Agar) para a confirmação da concentração do inóculo (NCCLS, 2003).

A metodologia utilizada foi a de difusão em cavidade ágar, empregando-se os meios de cultura, TSA para as culturas de *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *A. hydrophyla* e Müeller-Hinton, para as demais culturas. Inicialmente uma fina camada de ágar foi adicionada às placas de Petri de 15 cm de diâmetro, após a solidificação desses, esferas de vidro (estéreis) com 4mm de diâmetro foram posicionadas sobre o meio sólido. Com as culturas devidamente crescidas, alíquotas de 5 mL de TSB previamente padronizadas com auxílio da escala de McFarland foram transferidas para erlenmeyers contendo 400 mL de ágar Müeller-Hinton e 45 mL de TSB a uma temperatura de 40°C, obtendo-se uma concentração de 10^6 UFC/mL na cultura reveladora; assim, esse conteúdo foi depositado cuidadosamente sobre a camada anterior do meio. Após a solidificação, as esferas de vidro foram retiradas com auxílio de pinças estéreis, para formação dos “micropoços” ou “slots” de 0,4 mm, no qual foi depositado 10

μL da solução dos óleos essenciais diluídos em etanol PA. As diluições foram realizadas, em escala logarítmica, nas proporções de 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256 e 1:512 (óleo essencial/solvente), obtendo-se as concentrações 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90; 1,95 e 0,97 $\mu\text{g/mL}$. As placas foram incubadas por 24/48 horas, sendo medidos os halos de inibição formados. As análises foram realizadas em triplicata, obtendo-se, assim, o valor da concentração mínima inibitória (CMI), ou seja, a concentração mínima de óleos essenciais em que as bactérias não demonstraram crescimento de colônias visíveis, com redução de 99,9% das células viáveis (Ogunwande et al., 2005).

As variáveis relativas à formação do halo de crescimento foram submetidas à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%), utilizando o programa SISVAR (Ferreira, 2000).

4.4 Atividade antioxidante

4.4.1 Ensaio com DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila)

Prepararam-se 50 mL de uma solução de DPPH diluído em metanol na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$, construindo-se uma curva analítica com diferentes concentrações dessa solução (40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 1 $\mu\text{g/mL}$). Os óleos essenciais foram diluídos em metanol nas concentrações de 10,0; 5,0; 2,5; 2,0; 1,5; 1,0 e 0,5 mg/mL . Para avaliar a atividade antioxidante, foram colocados 0,3 mL de cada concentração do óleo essencial e 2,7 mL da solução estoque de DPPH em tubos de ensaio, em triplicata. Paralelamente, foi preparado o branco contendo todos os reagentes menos os óleos essenciais. Posteriormente, foram feitas as leituras após 30 minutos em um espectrofotômetro (SHIMATZU UV-160 1PC) / 515 nm (Tepe et al., 2005; Sousa et al., 2007).

Para a obtenção da CI_{50} (Concentração de Inibição de 50% do DPPH), calculou-se a porcentagem de DPPH remanescente, empregando a equação 1:

$$\%DPPHrem = \{[DPPH]am/[DPPH]bran\} * 100 \quad \text{(equação 1)}$$

Em que:

[DPPH]am: concentração de DPPH na concentração avaliada (óleo essencial ou composto);

[DPPH]bran: concentração de DPPH do branco (todos os reagentes exeto a amostra).

Para obter-se a porcentagem de DPPH inibido pelas amostras, utilizou-se a equação 2:

$$\%I = 100 - \%DPPHrem \quad \text{(equação 2)}$$

Para a obtenção da CI_{50} , plotaram-se os valores de %IDPPH versus as concentrações das amostras analisadas.

4.4.2 Ensaio com β -caroteno/ácido linoléico

Inicialmente foi preparada uma solução estoque com 5 mg de β -caroteno dissolvido em 1 mL de clorofórmio, 25 μ L de ácido linoléico e 200 mg de Tween 40. Evaporou-se o clorofórmio, utilizando-se um rotaevaporador a vácuo (BÜCHI ROTAVAPOR R114) à aproximadamente 25 °C. Em seguida, acrescentaram-se 1000 mL de água destilada saturada com oxigênio. Construiu-se uma curva analítica dessa solução-estoque de β -caroteno/ácido linoléico nas concentrações 5,0; 4,0; 3,0; 2,0; 1,0 e 0,5 mg/mL. Os óleos essenciais foram

diluídos em dimetil sulfóxido nas concentrações 5,0; 4,0; 3,0; 2,0; 1,0 e 0,5 mg/mL.

Para a avaliação da atividade antioxidante, foram colocados 0,3 mL de cada concentração do óleo essencial com 2,5 mL da solução-estoque de β -caroteno/ácido linoléico em tubos de ensaio, os quais ficaram em banho-maria por duas horas a 50°C, juntamente com o branco contendo todos os reagentes menos os óleos essenciais, em triplicata. Posteriormente, foram feitas as leituras em um espectrofotômetro (SHIMATZU UV-160 1PC) / 470 nm (Mata et al., 2007).

Para a obtenção de CI_{50} , calculou-se a porcentagem de caroteno remanescente, empregando-se a equação 3:

$$\%CAROTENOREM = \{ [CAROTENO]_{bran} / [CAROTENO]_{am} \} * 100 \text{ (equação 3)}$$

Em que:

[CAROTENO]_{bran}: concentração de β -caroteno/ácido linoléico do branco (todos os reagentes exceto a amostra).

[CAROTENO]_{am}: concentração de β -caroteno/ácido linoléico na concentração avaliada (óleo essencial ou composto);

A porcentagem de inibição das amostras, para a oxidação do β -caroteno foi obtida utilizando-se a equação 4:

$$\%I = 100 - \%CAROTENOREM \text{ (equação 4)}$$

Para termos de comparação, foi utilizado o timol em ambos os testes, pelo fato de ele apresentar atividade antioxidante já conhecida. Para o cálculo da CI_{50} , empregou-se a mesma metodologia citada para o teste do DPPH.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Óleos essenciais

Pelos dados descritos na Tabela 1, observa-se que foram identificados 24 constituintes presentes no óleo essencial de *M. Fragrans* com um rendimento de 8,20%, sendo majoritários os monoterpenos, terpin-4-ol (14,95%), sabineno (13,07%), γ -terpineno (11,22%) e β -pineno (9,30%) e, em menores concentrações, os fenilpropanos, miristicina (3,25%) metil-eugenol (2,44%) e safrol (1,92%) (Figura 1).

Estudos realizados por Tomaino et al. (2005), pesquisando o óleo essencial de *M. fragrans* originado da França, encontraram uma concentração maior de sabineno (20,2%) e de miristicina (9,58%) e menores concentrações de terpin-4-ol e γ -terpineno. Posteriormente, Singh et al. (2006), estudando a composição química de *M. fragrans* encontraram como constituintes majoritários o sabineno (20,22%), terpin-4-ol (12,08%), safrol (10,32%), α -pineno (9,7%), β -felandreno (6,56%) e γ -terpineno (5,93%). Provavelmente, essas diferenças ocorreram devido a vários fatores que podem afetar a composição de óleos essenciais, como: genético, lugar de cultivo, clima da região, horário de coleta, tipo de solo e adubação (Habermehl, 1998). Em geral para a maioria das espécies a baixa intensidade luminosa, por exemplo, diminui a produção de monoterpenos e pequenas variações diárias de temperaturas estimulam a produção de terpenóides (Lima et al., 2003). Outro fator relevante é o método de extração e secagem da planta, que afetam significativamente a qualidade do óleo essencial, acarretando diferenças entre os constituintes (Spricigo et al., 1999).

TABELA 1. Composição química do óleo essencial de sementes de *Myristica fragrans*

	Compostos	TR	IK	CM±D
1	α-tujeno	8,303	931	6,37 ± 1,20
2	α-pineno	8,550	939	9,49 ± 1,39
3	sabineno	10,216	976	13,07 ± 1,50
4	β-pineno	10,316	980	9,30 ± 1,28
5	β-mirceno	11,039	991	1,72 ± 0,31
6	α-felandreno	11,557	1005	0,95 ± 0,22
7	delta-3-careno	11,830	1011	0,66 ± 0,12
8	α-terpineno	12,133	1018	6,42 ± 0,87
9	p-cimeno	12,475	1026	1,60 ± 0,22
10	β-felandreno	12,693	1031	7,52 ± 1,01
11	γ-terpineno	14,140	1062	11,22 ± 1,30
12	hidrato de cis sabineno	14,505	1068	0,69 ± 0,08
13	terpinolene	15,539	1088	2,55 ± 0,38
14	Hidrato de trans-sabineno	15,990	1097	0,48 ± 0,27
15	linalol	16,146	1998	0,46 ± 0,20
16	terpin-4-ol	19,875	1177	14,95 ± 1,32
17	α-terpineol	20,489	1189	0,81 ± 0,10
18	safrol	25,131	1285	1,92 ± 0,12
19	α-copaeno	29,250	1376	0,61 ± 0,09
20	metil-eugenol	30,532	1401	2,44 ± 0,21
21	(E)-cariofileno	31,174	1418	0,35 ± 0,06
22	(E)-metil isoeugenol	34,541	1495	0,45 ± 0,09
23	miristicina	35,537	1520	3,25 ± 0,13
24	elemicina	37,002	1554	0,49 ± 0,06
Total Identificado				97,77 %
Rendimento (p/p)				8,20 %

TR = tempo de retenção (minutos), IK= índice de Kovat's tabelado (Adams, 2001), CM (%) ± D = concentração média (%) ± desvio-padrão da média

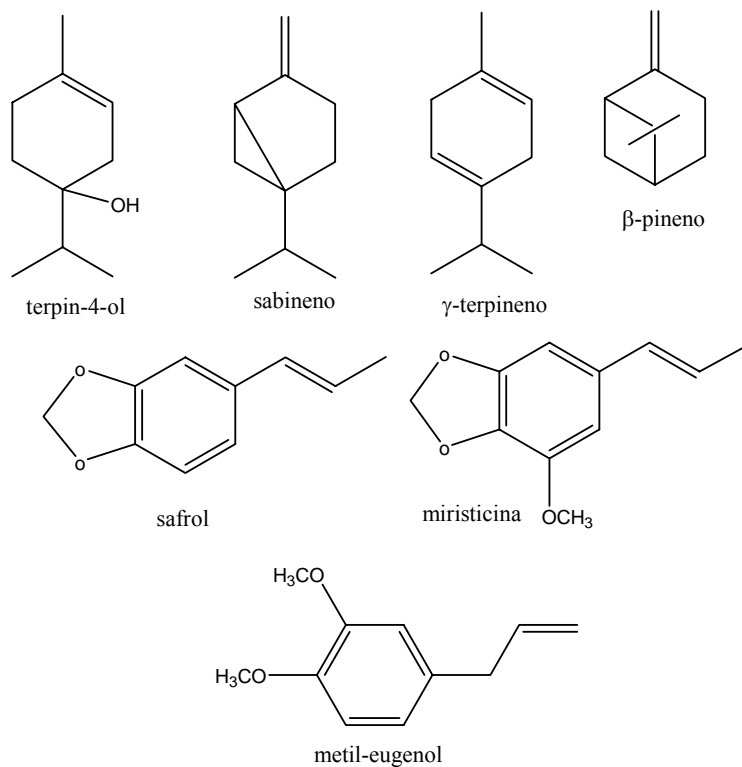


FIGURA 1. Estruturas químicas de alguns compostos presentes no óleo essencial de *Myristica fragrans*

Verifica-se (Tabela 2 e Figura 2) os constituintes encontrados no óleo essencial de *S. microphylla*, sendo os compostos majoritários o (E)-cariofileno (15,35%), os sesquiterpenos alcoólicos α -eudesmol (14,06%), β -eudesmol (8,74%) e γ -eudesmol (7,64%), sendo que o rendimento para seu óleo essencial foi de 0,13%.

TABELA 2. Composição química do óleo essencial de folhas de *Salvia microphylla*

	Compostos	TR	IK	CM±D
1	α-pineno	8,445	939	0,79 ± 0,14
2	canfeno	9,020	953	0,94 ± 0,17
3	β-pineno	10,244	980	0,94 ± 0,10
4	β-felandreno	12,641	1031	2,81 ± 0,84
5	1,8-cineol	12,749	1033	4,49 ± 0,90
6	cânfora	18,170	1143	2,58 ± 0,53
7	terpin-4-ol	19,799	1177	0,43 ± 0,08
8	acetato de isobornila	25,066	1285	4,94 ± 0,73
9	α-gurjuneno	30,759	1409	0,51 ± 0,06
10	(E)-cariofileno	31,088	1418	15,35 ± 1,32
11	aromadendreno	31,853	1439	2,68 ± 0,28
12	α-humuleno	32,449	1454	0,81 ± 0,03
13	alloaromadendreno	32,754	1461	1,34 ± 0,07
14	biciclogermacreno	34,350	1494	6,17 ± 0,19
15	γ-cadineno	35,090	1513	0,89 ± 0,02
16	delta cadineno	35,487	1524	1,15 ± 0,01
17	espatulenol	37,700	1576	0,42 ± 0,05
18	óxido de carofileno	37,857	1581	2,82 ± 2,16
19	globulol	37,974	1583	3,24 ± 0,95
20	γ-eudesmol	39,892	1630	7,64 ± 0,91
21	β-eudesmol	40,557	1649	8,74 ± 1,13
22	α-eudesmol	40,827	1652	14,06 ± 1,84
Total Identificado				83,74 %
Rendimento (p/p)				0,13 %

TR = tempo de retenção (minutos), IK= índice de Kovat's tabelado (Adams, 2001), CM (%) ± D = concentração média (%) ± desvio-padrão da média

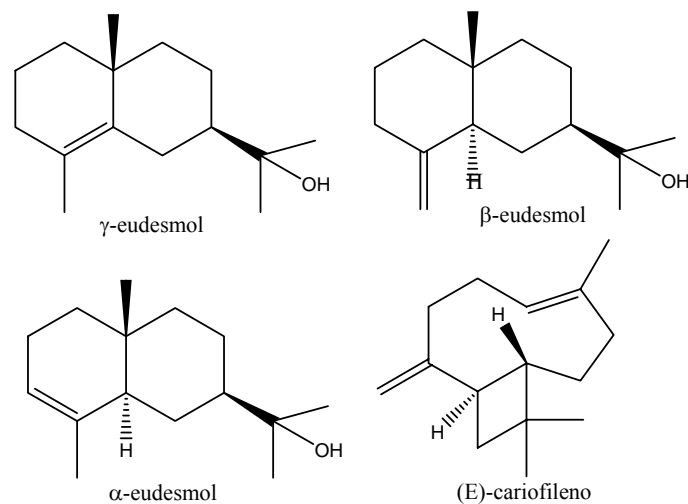


FIGURA 2. Estruturas químicas dos constituintes majoritários encontrados no óleo essencial de *Salvia microphylla*

Os constituintes majoritários comumente encontrados nos óleos essenciais de algumas espécies do gênero *Salvia*, como *S. tomentosa* Miller, *S. macrochlamys* L., *S. recognita* L., *S. officinalis* L., *S. triloba* L. e *S. hydrangea* DC. foram a tujona, α -pineno, β -pineno, 1,8-cineol, borneol e cânfora (Tepe et al., 2005; Tabanca et al., 2006; Delamare et al., 2007; Kotan et al., 2008).

Dentre os principais constituintes encontrados no óleo essencial da espécie *S. microphylla*, destacam-se os sesquiterpenos alcoólicos α , β e γ eudesmol e (E)-cariofileno (Tabela 2). Enquanto que Chialva et al. (1992), avaliando os constituintes de cinco espécies desse gênero (*S. canariensis* L., *S. confertiflora* Pohl, *S. cfr. mexicana* L., *S. microphylla* H.B.K. e *S. somaliensis* Vatke) relataram compostos similares com os encontrados neste estudo, tais como α -pineno, β -pineno, canfeno, 1,8-cineol, cânfora, acetato de bornila, (E)-cariofileno, globulol, espatulenol, α -eudesmol e β -eudesmol. Posteriormente, Aydogmus et al. (2006), caracterizando o extrato acetônico de *S. microphylla*

constatarem a presença do β -eudesmol e do 8- α -hidroxi- β -eudesmol, concluindo que, muitas vezes, os compostos que estão presentes no óleo essencial podem estar presentes no extrato e em outras partes da planta. Esses sesquiterpenos do grupo eudesmano podem ser encontrados em outros óleos essenciais, como no de *Centaurea sessilis* e *Centaurea armena* (Asteraceae), comprovado por Yayli et al. (2005), que caracterizaram o β -eudesmol em 12,4% e 19,3%, respectivamente. Recentemente, Dermici et al. (2008), pesquisando o óleo essencial de *Phlomis grandiflora* H.S. Thompson var. *grandiflora*, planta da mesma família da *Salvia* (Lamiaceae) encontraram como constituintes majoritários, o β -eudesmol (42,0%) e o α -eudesmol (16,0%)

Na medicina popular, várias propriedades medicamentosas são relatadas para a espécie *S. microphylla*, como para o tratamento de dores, gripes, resfriados, problemas circulatórios e cardíacos, contudo, sem comprovação por estudos científicos. Entretanto, vários constituintes presentes no seu óleo essencial têm importantes atividades comprovadas. O β -eudesmol pode ser utilizado como antídoto para tratar intoxicação por organofosforado (Chiou et al., 1995), possui atividade antiangiogênese (Tsuneki et al., 2005); o seu isômero, α -eudesmol, pode ser utilizado no tratamento de inflamação neurogênica, como a enxaqueca (Asakura et al., 2000), o (E)-cariofileno possui atividade anestésica local (Ghelardini et al., 2001) e anti-inflamatória (Fernandes et al., 2007) e o globulol com propriedade fungistática e fungicida (Aleu et al., 2001; Salgado et al., 2003).

5.2 Atividade bactericida

Observa-se que os óleos essenciais testados apresentaram atividade bactericida nas concentrações avaliadas, inibindo tanto bactérias Gram-negativas como Gram-positivas (Tabela 3). Verifica-se que a bactéria *E. coli* foi a mais resistente, apresentando alto valor do CMI para o óleo essencial de *M. fragrans*

e total resistência ao óleo essencial de *S. microphylla* nas concentrações avaliadas. Esses resultados estão de acordo com aqueles apresentados por Burt (2004), o qual evidenciou que bactérias Gram-negativas, em geral, são menos susceptíveis à ação dos óleos essenciais que as Gram-positivas.

TABELA 3. Concentração mínima inibitória CMI ($\mu\text{g/mL}$) causada pelos óleos essenciais de *Myristica fragrans* e de *Salvia microphylla*.

Bactérias avaliadas	Gram	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	
		<i>M. fragrans</i>	<i>S. microphylla</i>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	-	250,00	N.O.
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	-	7,81	250,00
<i>Salmonella Cholerasuis</i> ATCC 6539	-	3,90	3,90
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25853	-	15,62	3,90
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	-	7,81	3,90
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	+	31,25	125,00
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	125,00	3,90
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19117	+	31,25	3,90
<i>Listeria innocua</i> ATCC 3309	+	62,50	7,81

N.O = Inibição não observada

O óleo essencial de *S. microphylla* apresentou menores valores do CMI em relação ao óleo essencial de *M. fragrans*, para a maioria das bactérias. Observam-se baixos valores de CMI (3,90-7,81 $\mu\text{g/mL}$) para bactérias do gênero

Listeria, *Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Salmonella Choleraesuis*.

O efeito antimicrobiano dos óleos essenciais depende de vários fatores, entre eles a hidrofobicidade e a capacidade de partição na membrana plasmática. Estudos de Sharififar et al. (2007) demonstraram que o óleo essencial da espécie *Zataria multiflora* Boiss, rico em timol (37,59%) e carvacrol (33,65%), apresentou atividade bactericida sobre bactérias (Gram-negativas). Inferiram também que a presença desses compostos foi responsável por esta atividade. De acordo com trabalhos anteriores de Helander et al. (1998) verifica-se que esses compostos são capazes de desintegrar a membrana externa de bactérias Gram-negativas, liberando lipopolissacarídeos e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática; enquanto que, Ultee et al. (2002) observaram distorção da estrutura física da membrana, o que pode causar uma expansão e desestabilização, aumentando sua fluidez e sua permeabilidade. De acordo com Burt & Reinders (2003), óleos essenciais que apresentam esses compostos fenólicos são mais ativos em bactérias Gram-negativas. Constataram uma excelente atividade bactericida para *E. coli* O157:H7 (Gram-negativa) utilizando os óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris*) e orégano (*Origanum vulgare*). Estudos de Velluti et al. (2003) inferiram que a atividade antimicrobiana desses compostos hidroxilados pode estar relacionada com as ligações de hidrogênio, que possivelmente interagem com os sítios ativos das enzimas microbianas.

Outros trabalhos, como os de Lambert et al. (2001) e Bakkali et al. (2008), citam que os compostos lipofílicos encontrados nos óleos essenciais são mais ativos em bactérias Gram-positivas, pois são capazes de romper a sua membrana composta de diferentes polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípidios, podendo também danificar a parede celular e levar à liberação de macromoléculas e lise celular. Em bactérias Gram-positivas, a parede celular externa é constituída por uma camada grossa de peptidoglicano (polissacarídeo),

com teor de lipídeos nulo ou muito baixo. Para as bactérias Gram-negativas, a membrana externa é rica em lipídeos, gerando dificuldade para a entrada e saída de algumas moléculas (Burt, 2004; Loguercio et al., 2005). Entretanto, o mecanismo da atividade antimicrobiana de terpenos não é completamente esclarecido, sabe-se que está relacionada à ruptura da membrana plasmática, devido ao seu caráter lipofílico (Cowan, 1999).

Nos óleos essenciais de *S. microphylla* e *M. fragrans*, não foram encontrados esses compostos fenólicos, contudo, foram encontrados vários sesquiterpenos alcoólicos, como o espatulenol, globulol, α -eudesmol, β -eudesmol e γ -eudesmol. Pesquisas de Dorman & Deans (2000) e Koroch et al. (2007) encontraram atividade bactericida (bactérias Gram-positivas e Gram-negativas) para os álcoois terpênicos borneol, 1,8 cineol e terpin-4-ol, sendo esses dois últimos também encontrados na espécie *S. microphylla*, na concentração de 4,49% e 0,43% respectivamente. Segundo esses, geralmente os álcoois agem como desnaturantes de proteínas, solventes ou agentes desidratadores. Comparando os resultados obtidos com o destes autores, infere-se que os álcoois presentes no óleo essencial de *S. microphylla* possam ser os responsáveis pela atividade bactericida encontrada neste estudo.

A presença do grupo acetato (CH_3COO^-) nas moléculas que compõem os óleos essenciais é também um importante indicio da atividade antimicrobiana. O óleo essencial de *S. microphylla* apresentou na sua constituição o acetato de isobornila (4,94%). Dorman & Deans (2000) observaram que o acetato de bornila e o acetato de geranila apresentaram maior atividade bactericida que o borneol e geraniol. De acordo com esses pesquisadores, o grupo acetato é um dos fatores que pode contribuir para o aumento desta atividade biológica.

Estudos de Dermici et al. (2008), avaliando a atividade bactericida do óleo essencial de *Phlomis grandiflora* H.S. Thompson var. *grandiflora*, encontraram valores da CMI de (250-500 $\mu\text{g/mL}$) para *Aeromonas hydrophila*,

Listeria monocytogenes, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, tendo como principais constituintes o β -eudesmol e o α -eudesmol. Para os óleos essenciais deste estudo, os valores de CMI foram menores, menos para *Aeromonas hydrophila*, que teve a CMI próximo de 250 $\mu\text{g/mL}$.

O óleo essencial de *M. fragrans* apresentou alta atividade bactericida para as espécies *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 e *Salmonella Choleraesuis* ATCC 6539, com valores da CMI de (3,90-7,81 $\mu\text{g/mL}$) e, para a *Pseudomonas aeruginosa* com ATCC 25853 e ATCC 15442, a CMI foi entre (7,81-15,62 $\mu\text{g/mL}$). Dorman & Deans (2000), avaliando o óleo essencial da mesma espécie, não encontraram atividade para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Isso ocorre devido à dificuldade em se comparar resultados em condições experimentais diferentes, às várias linhagens existentes de uma mesma bactéria, que podem ou não apresentar maior resistência e, a diferença entre os constituintes de um mesmo óleo essenciais (Dorman & Deans, 2000; Burt, 2004).

Entre as diversas técnicas existentes para a determinação da atividade bactericida de óleos essenciais, a difusão em ágar é a mais utilizada. Recentemente, foi demonstrado que a alta volatilidade apresentada pelos óleos essenciais contribui para a formação do halo de inibição, indicando que a validade desse método para a avaliação da atividade bactericida de óleos essenciais, pois a baixa capacidade de difusão no ágar é compensada pela sua elevada volatilidade (Inouye et al., 2006).

A atividade bactericida do óleo essencial de *M. fragrans* foi evidenciada para inúmeras bactérias, sendo algumas dessas também avaliadas neste estudo, como *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella pullorum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes*, *Citrobacter freundii*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus vulgaricus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mettegeri*, *Enterobacter cloacea*,

Proteus penneri e *Bacillus cereus* (Smith-Palmer et al., 1998; Dorman & Deans 2000; Malti, 2008).

Vários compostos presentes no óleo essencial de *M. fragrans* apresentam atividade bactericida, como o terpin-4-ol e α -pineno (Dorman & Deans 2000). Estudos realizados por Hinou et al. (1989) demonstram que também existe diferença na atividade de isômeros; os α - isômeros são inativos em relação aos β - isômeros, assim como os (Z) / cis - isômeros em relação aos (E) / trans - isômeros. Vários desses isômeros ativos foram encontrados para o referido óleo, entre eles estão o β -pineno, β -mirceno, β -felandreno, (E)-cariofileno e (E)-metil isoeugenol. Outro fator importante é a presença de instauração no anel, que também aumenta a atividade bactericida de compostos como α e γ -terpineno e terpinoleno. Apesar disso, o p-cimeno quando avaliado individualmente apresentou baixa atividade bactericida (Dorman & Deans 2000). Estudos de Ultee et al. (2000) relataram que esse monoterpene, quando combinado como o carvacrol atua em sinergismo aumentando seu potencial biológico.

Takikawa et al. (2002) avaliaram a atividade bactericida do óleo essencial de *M. fragrans* para *E. coli* O157:H17 e constataram que essa atividade se deve principalmente à presença do β -pineno, testado isoladamente. Narasimahan et al. (2004) e Narasimahan & Dhake (2006) evidenciaram a atividade bactericida da miristicina, sugerindo que isso ocorreu devido à presença da cadeia lateral insaturada ligada ao anel aromático. Vários compostos apresentam essas características químicas, como o (E)-metil isoeugenol, metil-eugenol, miristicina, elemicina e safrol, que correspondem a 8,5% da constituição do óleo essencial de *M. fragrans* avaliado.

Kalemba & Kunicka (2003) resumem a atividade antimicrobiana dos constituintes dos óleos essenciais da seguinte maneira; os fenóis são os mais ativos, em seguida, em ordem decrescente, estão os aldeídos, cetonas, álcoois e éteres. Analisando a constituição dos óleos essenciais em estudo, observa-se, em

relação a cada uma dessas classes, que outros fatores devem ser levados em consideração, principalmente o isomerismo e o sinergismo dos constituintes.

5.3 Atividade Antioxidante

O efeito inibitório da peroxidação lipídica pelos óleos essenciais foi realizado pelo teste β -caroteno/ácido linoléico. Esse teste simula a oxidação de componentes da membrana lipídica na presença de antioxidantes dentro da célula (Tepe et al., 2006; Eminagaoglu et al., 2007).

De acordo com os resultados da Tabela 4, observa-se que os óleos essenciais avaliados apresentaram atividade antioxidante. O óleo essencial de *S. microphylla* apresentou um valor de 770 $\mu\text{g/mL}$ para CI_{50} em relação ao óleo essencial de *M. fragrans* (CI_{50} 976 $\mu\text{g/mL}$) e ao composto timol (CI_{50} 1017 $\mu\text{g/mL}$), inferindo que o óleo essencial de *S. microphylla* apresenta maior efeito antioxidante pelo teste do β -caroteno/ácido linoléico.

No experimento com o DPPH, foi observada atividade antioxidante apenas para o timol (CI_{50} 714 $\mu\text{g/mL}$). Eminagaoglu et al. (2007), trabalhando com a mesma técnica, encontraram com o valor de 245 $\mu\text{g/mL}$ (CI_{50}) para seu isômero, o carvacrol. De acordo com pesquisas de Mata et al. (2007), esse teste não é aplicado para óleos essenciais, devido à sua baixa solubilidade nas condições do experimento.

O método de oxidação do β -caroteno/ácido linoléico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. Dessa forma, os produtos formados com a degradação oxidativa do ácido linoléico reagem com o β -caroteno, ocorrendo sua descoloração, que é medida por espectrofotometria. Com a adição de compostos antioxidantes, eles reagem com esses produtos, não ocorrendo sua descoloração (Tepe et al., 2006; Mata et al., 2007). O teste do DPPH mede a capacidade de captura do radical livre (1,1-difenil-2-picrilidrazila), de coloração púrpura, formando um radical estável e

incolor pelo recebimento de átomos de hidrogênio radicalar e elétrons (Duarte-Almeida et al., 2006).

TABELA 4. Atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Salvia microphyla*, *Myristica fragrans* e do Timol, pelos testes do DPPH e β -caroteno/ácido linoléico.

Componentes avaliados	CI ₅₀ (µg/mL)	
	DPPH	β -caroteno/ácido linoléico
Timol	714	1017
<i>S. microphyla</i>	N	770
<i>M. fragrans</i>	N	976

CI₅₀ = Concentração de Inibição de 50% e N = atividade não observada

A atividade antioxidante do óleo essencial de *M. fragrans* também foi evidenciada em outros estudos pelo teste do ácido tiobarbitúrico e do DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila) (Dorman et al., 1995; Dorman & Deans, 2000; Tomaino et al., 2005; Singh et al., 2006). Vários compostos presentes no óleo essencial de *M. fragrans* apresentam atividade antioxidante. Zhang et al. (2006) constataram que a miristicina presente no óleo essencial de salsinha (*Petroselinum crispum*), apresentando na sua constituição um grupo metoxila, possui uma moderada atividade antioxidante, ao passo que, o apiol com dois grupos metoxilas ligados no anel aromático possui maior atividade devido à simetria existente entre eles. Portanto, pode-se inferir que a elemicina encontrada no óleo essencial de *M. fragrans* com três grupos metoxila pode ser uma grande contribuidora da atividade antioxidante desse óleo, como também o metil-eugenol e o (E)-metil isoeugenol, que apresentam em sua estrutura dois

grupos metoxilas. Maeda et al. (2008) pesquisando o extrato de sementes de *M. fragrans* coletada no Japão, utilizando o acetato de etila como solvente, encontraram alta concentração de fenilpropanóides como a miristicina (17,60%), 4 - alil - 2,6 - dimetoxifenol (7,36%), elemicina (3,24%), metil-eugenol (2,27%), isoeugenol (2,15%), metil-isoeugenol (1,61%) e eugenol (1,59%). Dentre esses, observaram que apenas os compostos eugenol, isoeugenol e 4 - alil - 2,6 - dimetoxifenol apresentaram atividade antioxidante pelo teste do DPPH.

De acordo com Ruberto & Baratta (2000), os monoterpenos sabineno e α -terpineno apresentam alta atividade antioxidante em relação a outros monoterpenos cíclicos. Inúmeros estudos demonstram que os compostos que possuem grupos hidroxilas (-OH) ligados ao anel aromático, como o timol e carvacrol, são considerados os compostos com maior atividade antioxidante, entre os compostos presentes em óleos essenciais. Como esses apresentam caráter ácido, são capazes de doar átomos de hidrogênio com um elétron desemparelhado (H•), formando um radical que é estabilizado pelas estruturas de ressonância resultante da deslocalização dos elétrons na molécula. (Ruberto & Baratta 2000; Carvalho, 2004).

O óleo essencial de *S. microphylla* apresentou maior atividade antioxidante em relação ao óleo essencial de *M. fragrans*. Observa-se na sua constituição alguns monoterpenos monocíclicos com atividade antioxidante já relatada. Os sesquiterpenos, tais como (E)-cariofileno, aromadendreno e alloaromadendreno, apresentam baixa atividade antioxidante, assim como os sesquiterpenos alcoólicos α , β e γ eudesmol; em geral, álcoois acíclicos, como o nerol, geraniol e α -bisabolol, apresentam maior atividade em relação aos cíclicos, como α -terpineol, terpin-4-ol e globulol (Ruberto & Baratta 2000). O sinergismo entre constituintes de óleos essenciais já foi evidenciado (Dorman et al., 1995; Vardar-Ünlü et al., 2003). Diante disso, infere-se que a atividade

antioxidante encontrada para o *S. microphylla* possa ter ocorrido pelo fato dos compostos presentes nesse óleo essencial agirem sinergicamente.

Estudos realizados por Mata et al. (2007) encontraram atividade pelo teste do β -caroteno/ácido linoléico para os óleos essenciais de *Foeniculum vulgare* (CI₅₀ 86,9 μ g/mL), *Thymus serpyllum* (CI₅₀ 96,9 μ g/mL), *Rosmarinus officinalis* (CI₅₀ 233,0 μ g/mL), *Mentha spicata* (CI₅₀ 554,0 μ g/mL) e *Mentha pulegium* (CI₅₀ 1489,0 μ g/mL). Constataram-se que o valor da CI₅₀ para o timol foi alto (CI₅₀ 1017 μ g/mL), em relação aos encontrados por Mata et al. (2007). Segundo pesquisas de Vardar-Ünlü et al. (2003), isso ocorre em para vários compostos quando testados separadamente do óleo essencial, indicando que outros constituintes com estrutura química diferente podem contribuir para alta atividade antioxidante encontrada para muitos óleos essenciais.

Durante o processamento e a estocagem de alimentos ricos em lipídeos, ocorre processos oxidativos e de deteriorização, fazendo necessário, o uso de antioxidantes sintéticos. Dentre os mais utilizados, estão o BHA (2-ter-(butil-4)-metoxifenol) e BHT (2,6-di(ter-butil)-p-cresol), que apresentam alta toxicidade em doses elevadas (Ames, 1983). Alguns estudos têm demonstrado que o uso de óleos essenciais em alimentos protege contra o processo oxidativo durante sua estocagem. Tomaino et al. (2005), avaliando a capacidade antioxidante de óleos essenciais de cravo (*Eugenia caryophyllata*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), manjeriço (*Ocimum basilicum*), orégano (*Origanum floribundum*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e noz-moscada (*Myristica fragrans*) em azeite de oliva, a uma temperatura de 180°C, durante 10 minutos, relataram que o óleo essencial de noz-moscada sofreu modificações na sua constituição e na sua capacidade antioxidante. Estudos de Ozkan et al. (2007), avaliando a atividade antioxidante do óleo essencial de *Satureja cíclica* (Lamiaceae) em margarina, constataram que esse óleo pode ser usado como antioxidante natural e aromatizante. Recentemente, Olmedo et al. (2008), avaliando a atividade antioxidante de óleos

essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e louro (*Laurus nobilis*) em amendoim salgados e fritos, constataram que os óleos essenciais de louro e orégano possuem capacidade antioxidante similar à do BHT, e que, durante a estocagem, intensificaram o aroma do amendoim. Segundo os autores, a preferência ou não do óleo essencial quando presente em um determinado alimento deve ser avaliada, devido ao impacto que causará no seu sabor. Outro fator que deve ser levado em consideração é a matriz alimentícia em que os óleos essenciais estão inseridos, uma vez que esse possui compostos instáveis, podendo ocorrer reações de oxidação, polimerização ou outro tipo de modificação estrutural (Bakkali et al., 2008).

6 CONCLUSÕES

Os constituintes majoritários do óleo essencial de *M. fragrans* foram os monoterpenóides terpin-4-ol (14,95%), sabineno (13,07%), γ -terpineno (11,22%) e β -pineno (9,30%) e, em menores concentrações, os fenilpropanóides metil-eugenol (2,44%), miristicina (3,25%) e safrol (1,92%).

Os constituintes majoritários do óleo essencial de *S. microphylla* foram o (E)-cariofileno (15,35%) e os sesquiterpenos alcoólicos α -eudesmol (14,06%), β -eudesmol (8,745) e γ -eudesmol (7,64%).

Os óleos essenciais apresentaram atividade bactericida, inibindo tanto bactérias Gram-negativas como Gram-positivas. O óleo essencial de *S. microphylla* apresentou menores valores de CMI (3,90-7,81 $\mu\text{g/mL}$) em relação ao óleo essencial de *M. fragrans* com CMI (3,90-31,25 $\mu\text{g/mL}$) para a maioria das bactérias, com exceção a *E.coli*, *A. hydrophila* e *S. aureus*.

A atividade antioxidante foi evidenciada pelo teste β -caroteno/ácido linoléico para o óleo essencial de *M. fragrans* com CI_{50} 976 $\mu\text{g/mL}$ e para o óleo de *S. microphylla* com CI_{50} 770 $\mu\text{g/mL}$.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oils components by gás chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing, 2001. 456 p.
- ALEU, J.; HANSON, J.R.; HERNÁNDEZ GALÁN, R.; COLLADO, I.G. Biotransformation of the fungistatic sesquiterpenoids patchoulol, ginsenol, cedrol and globulol by *Botrytis cinerea*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 11, n. 4/6, p. 329-334, Jan. 2001.
- AMES, B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radical and degenerative diseases. **Science**, Washington, v. 221, n. 4617, p. 1256-1263, 1983.
- ASAKURA, K.; KANEMASA, T.; MINAGAWA, K.; KAGAWA, K.; YAGAMI, T.; NAKAJIMA, M.; NINOMIYA, M. α -Eudesmol, a P/Q-type Ca²⁺ channel blocker, inhibits neurogenic vasodilation and extravasation following electrical stimulation of trigeminal ganglion. **Brain Research**, Amsterdam, v. 873, n. 1, p. 94-1014, Aug. 2000.
- AYDOGMUS, Z.; YESİLYURT, V.; TOPCU, G. Constituents of *Salvia microphylla*. **Natural Product Research**, Abington, v. 20, n. 8, p. 775-781, July, 2006.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.
- BURT, S.A.; REINDERS, R.D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 162-167, 2003.

CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios**: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. 480 p.

CASTRO, D.P.; CARDOSO, M.G.; MORAES, J.C.; SANTOS, N.M.; BALIZA, D.P. Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: *Noctuidae*) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 27-32, 2006.

CHAUBEY, M.K. Fumigant toxicity of essential oils from some common spices against Pulse Beetle, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Oil Science**, Tokyo, v. 57, n. 3, p.1771-179, 2008.

CHIALVA, F.; MONGUZZI, F.; MANITTO, P. Composition of the essential oils of five *Salvia* species. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 4, n. 5, p. 447-455, 1992.

CHIOU, L.C.; LING, J.Y.; CHANG, C.C. β -Eudesmol as an antidote for intoxication from organophosphorus anticholinesterase agents. **European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 292, n. 2, p. 151-156, Jan. 1995.

CHUNG, J.Y.; CHOO, J.H.; LEE, M.H.; HWANG, J. Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragrans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine**, Jena, v. 13, n. 4, p. 261-266, Mar. 2006.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiological Reviews**, Washington, v. 12, n. 4, p. 564-82, Oct. 1999.

DELAMARE, A.P.L.; MOSCHEN-PISTORELLO, I.T.; ARTICO, L.; ATTI-SERAFINI, L.; ECHEVERRIGARAY, S. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**, Oxford, v. 100, n. 2, p. 603-608, 2007.

DEMIRCI, F.; GUVEN, K.; DEMIRCI, B.; DADANDI, M.Y.; BASER, K.H.C. Antibacterial activity of two *Phlomis* essential oils against food pathogens. **Food Control**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1159-1164, Dec. 2008.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DORMAN, D.H.J.; DEANS, S.G.; NOBLE, R.C. Evaluation in vitro of plant essential oils as natural anti-oxidants. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 7, n. 6, p. 645-651, Nov./Dec. 1995.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema b-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, abr./jun. 2006.

ESQUIVEL, B.; CARDENAS, J.; RODRIGUEZ-HAH, L. The diterpenoid constituents of *Salvia fulgens* and *Salvia microphylla*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 50, n. 4, p. 738-740, July/Aug. 1987.

EMINAGAOGLU, O.; TEPE, B.; YUMRUTA, O.; ASKIN-AKPULAT, H.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A. The *in vitro* antioxidative properties of the essential oil and methanol extract of *Satureja spicigera* (K. Koch.) Boiss and *Satureja cuneifolia* ten. **Food Chemistry**, Oxford, v. 100, n. 1, p. 339-343, 2007.

FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; MEDEIROS, R.; CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PIANOWSKI, L.F.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 569, n. 3, p. 228-236, Aug. 2007.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; MANNELLI, L.D.C.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. **II Farmaco**, Pavia, v. 56, n. 5/7, p.387-389 387, 2001.

HABERMEHL, G.G. Secondary and tertiary metabolites as plant toxins. **Toxicon**, Oxford, v. 36, n. 11, p. 1707-1719, Nov. 1998.

HELANDER, I.M.; ALAKOMI, H.L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E.J.; GORRIS, L.G.M., WRIGHT, A. von. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, Sept. 1998.

HINOUE, J.B.; HARVALA, C.E.; HINOUE, E.B. Antimicrobial activity screening of 32 common constituents of essential oils. **Pharmazie**, Eschborn, v. 44, n. 4, p. 302-303, Apr. 1989.

HUANG, Y.; TAN, J.M.W.L.; KINI, R.M.S.; HO, H. Toxic and antifeedant action of nutmeg oil against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 289-298, 1997.

INOUE, S.; UCHIDA, K.; ABE, S. Vapor activity of 72 essential oils against a *Trichophyton mentagrophytes*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 210-216, Aug. 2006.

ISOGAI, A.; SUZUKI, A.; TAMURA, S. Structure of dimeric phenoxypropanoids from *Myristica fragrans*. **Agricultural & Biological Chemistry**, Tokyo, v. 37, n. 1, p. 193-194, Jan. 1973.

JUNG, W.C.; JANG, Y.S.; HIEU, T.T.; LEE, C.K.; AHN, Y.J. Toxicity of *Myristica fragrans* seed compounds against *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 44, n. 3, p. 524-529, May 2007.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 10, n. 10, p. 813-829, May 2003.

KOROCH, A.R.; JULIANI, H.R.; ZYGADLO, J.A. Bioactivity of essential oils and their components. In: BERGER, R.G. (Ed.). **Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainable**. Berlin: Springer, 2007. chap. 5, p. 87-115.

KOTAN, R.; SABAN, K.; AHMET, C.; MEMIS, K.; YUSUF, K.; HAMDULLAH, K. Antimicrobial and insecticidal activities of essential oil isolated from Turkish *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.36, p. 360-368, 2008.

KUO, Y.H. Studies on several naturally occurring lignans. **Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi**, Benjing, v. 5, n. 11, p. 621-624, 1989.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.; NYCHAS, G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 453-462, Sept. 2001.

LIMA, H.R.P.; KAPLAN, M.A.C.; CRUZ, A.V.M. de. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 71-77, ago./dez. 2003.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A.C.; HENZEL, A.; WITT, N.M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 371-376, mar./abr. 2005.

MAEDA, A.; TANIMOTO, S.; ABE, T.; KAZAMA, S.; TANIZAWA, H.; NOMURA, M. Chemical constituents of *Myristica fragrans* Houttuyn seed and their physiological activities. **The Pharmaceutical Society of Japan**, Shibuyam v. 128, n. 1, p. 129-133, Jan. 2008.

MALTI, J.; BOURHIM, N.; AMAROUCH, H. Toxicity and antibacterial effect of Mace of *Myristica fragrans* used in moroccan gastronomy: biochemical and histological impact. **Journal of Food Safety**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 422-441, Aug. 2008.

MATA, A.T.; PROENÇA, C.; FERREIRA, A.R.; SERRALHEIRO, M.L.M.; NOGUEIRA, J.M.F.; ARAÚJO, E.M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as portuguese food spices. **Food Chemistry**, Oxford, v. 103, n. 3, p. 778-786, 2007.

NARASIMHAN, B.; BELSARE, D.; PHARANDE, P.; MOURYA, V.; DHAKE, A. Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 39, n. 10, p. 827-834, Oct. 2004.

NARASIMHAN, B.; DHAKE, A.S. Antibacterial principles from *Myristica fragrans* seeds **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 9, n. 3, p. 395-399, 2006.

THE NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard. 6. ed. Wayne, 2003. 49 p (NCCLS. Document M7-A6, v. 23, n.2)

OGUNWANDE, I.A.; OLAWORE, N.O.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T.M.; SCHIMIDT, J.M.; SETZER, W.N. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **The International Journal of Aromatherapy**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 147-152, Jan. 2005.

OLMEDO, R.; NEPOTE, V.; MESTRALLET, M.G.; GROSSO, N.R. Effect of the essential oil addition on the oxidative stability of fried salted peanuts. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 43, n. 11, p. 1935-1944, Nov. 2008.

OZKAN, G.; SIMSEK, B.; KULEASAN, H. Antioxidant activities of *Satureja ciclicica* essential oil in butter and *in vitro*. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 79, n. 4, p. 1391-1396, Apr. 2007.

PARK, I.K.; KIM, J.N.; LEE, Y.S.; LEE, S.G.; AHN, Y.J.; SHIN, S.C. Toxicity of plant essential oils and their components against *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 101, n. 1, p. 139-144, Jan. 2008.

PIMENTEL, F.A.; CARDOSO, M.G.; SALGADO, A.P.S.P.; AGUIAR, P.M., SILVA, V.F.; MORAIS, A.R.; NELSON, D.L. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 373-375, mar./abr. 2006.

RITTER, M.R.; SOBIERAJSKI, G.R.; SCHENKEL, E.P.; MENTZ L.A. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 12, n. 2, p.51-62, 2002.

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

SALGADO, A.P.S.P.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; SOUZA, J.A.; ABREU, M.C.; PINTO, J.E.B.P. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 249-254, mar./abr. 2003.

SHARIFIFAR, F.; MOSHAFI, M.H.; MANSOURI, S.H.; HHODASHENAS, M.; KHOSHNOODI, M. *In vitro* evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. **Food Control**, Oxford, v.18, n. 7, p. 800-805, July 2007.

SIMMONDS, M.S.J.; BLANEY, W.M.; ESQUIVEL, B.; RODRIGUEZ-HAHN, L. Effect of Clerodane-Type Diterpenoids Isolated from *Salvia* spp. on the Feeding Behaviour of *Spodoptera littoralis*. **Pest icide Science**, Sussex, v. 47, n. 1, p. 17-23, May 1996.

SINGH, G.; MARIMUTHU, P.; HELUANI, C.S.; CATALAN, C. Antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Myristica fragrans* Houtt. (aril part). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, n. 2, p. 141-148, Mar./Apr. 2006.

SKOGLUND, L.A.; JORKJEND, L. Postoperative pain experience after gingivectomies using different combinations of local anaesthetic agents and periodontal dressings. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 18, n. 3, p. 204-209, Mar. 1991.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 118-122, Feb. 1998.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA JÚNIOR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.D.M.; BRANDAO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, mar./abr. 2007.

SPRICIGO, C.B.; PINTO, L.T.; BOLZAN, A.; FERREIRA, A. Extraction of essential oil and lipids from nutmeg by liquid carbon dioxide Novais. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 253-259, July 1999.

TABANCA, N.; DEMIRCI, B.; BASER, K.H.; AYTAC, Z.; EKICI, M.; KHAN, S.I.; JACOB, M.R.; WEDGE, D.E. Chemical composition and antifungal activity of *Salvia macrochlamys* and *Salvia recognita* essential oils. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 18, p. 6593-6597, Sept. 2006.

TAKIKAWA, A.; ABE, K.; YAMAMOTO, M.; ISHIMARU, S.; YASUI, M.; OKUBO, Y.; YOKOIGAWA, K. Antimicrobial activity of nutmeg against *Escherichia coli* O157. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 94, n. 4, p. 315-320, Oct. 2002.

TEPE, B.; AKPULAT, H.A.; SOKMEN, M.; DAFERERA, D.; YUMRUTAS, O.; ENES, A.; MOSCHOS, P.; SOKMENA A. O screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisetum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. **Food Chemistry**, Oxford, v. 97, n. 4, p. 719-724, 2006

TEPE, B.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; SOKMEN, M.; POLISSIOU, M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). **Food Chemistry**, Oxford, v. 90, n. 3, p. 333-340, 2005.

TOMAINO, A.; CIMINO, F.; ZIMBALATTI, V.; VENUTI, V.; SULFARO, V.; PASQUALE, A; SAIJA, A. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. **Food Chemistry**, Oxford, v. 89, n. 4, p. 549-554, 2005.

TSUNEKI, H.; MA, E.L.; KOBAYASHI, S.; SEKIZAKI, N.; MAEKAWA, K.; SASAOKA, T.; WANG, M.W.; KIMURA, I. Antiangiogenic activity of β -eudesmol in vitro and in vivo. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 512, n. 2/3, p. 105-11511, Apr. 2005.

ULTEE, A.; BENNINK, M.H.J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 4, p. 1561-1568, 2002.

ULTEE, A.; SLUMP, R.A.; STEGING, G.; SMID, E. J. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 63, n. 5, p. 620-624, May 2000.

VARDAR-ÜNLÜ, G.; CANDAN, F.; SÖKMEN, A.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SÖKMEN, M.; DÖNMEZ, E.; TEPE, B. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and methanol extract of *Thymus pectinatus* Fish. et Mey. Var. *Pectinatus* (Lamiaceae). **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 1, p. 63-67, Jan. 2003.

VELUTTI, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J.; EGIDO, J.; MARÍN, S. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 89, n. 2/3, p.145-154, Dec. 2003.

ZHANG, H.; CHEN, F.; WAN, X.; YAO, H.Y. Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. **Food Research International**, Amsterdam, v. 39, n. 8, p. 833-839, 2006.

YAYLI, N.; YASSAR, A.; GÜLEÇ, C.; USTA, A.; KOLAYLI, S.; COSKUNCELEBI, K.; KARAOGLU, S. Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea sessilis* and *Centaurea armena*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 66, n. 14, p. 1741-1745, July 2005.

CAPITULO 2

Atividade inseticida dos óleos essenciais de *Myristica fragrans* Houtt. e de *Salvia microphylla* H.B.K. em *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Tenebrio molitor* L., 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae)

1 RESUMO

LIMA, Rafaela Karin. Atividade inseticida dos óleos essenciais de *Myristica fragrans* Houtt. e de *Salvia microphylla* H.B.K. em *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Tenebrio molitor* L., 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae). In: _____. **Óleos essenciais de *Myristica fragrans* Houtt. e de *Salvia microphylla* H.B.K.:** caracterização química, atividade biológica e antioxidante. 2008. Cap. 2, p. 95-130. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

As plantas produzem uma variedade de compostos no seu metabolismo secundário, que estão relacionados com a interação da planta com o meio ambiente, como, por exemplo, a defesa contra insetos, bactérias e fungos. Os óleos essenciais constituem um tipo de metabólito secundário de grande importância, tanto que estão sendo cada vez mais estudados e utilizados, juntamente com o manejo integrado de pragas (MIP), por apresentarem baixa toxicidade ao homem e ao meio ambiente. Neste estudo, objetivou-se caracterizar quimicamente os óleos essenciais de *Myristica fragrans* Houtt. e de *Salvia microphylla* H.B.K., bem como avaliar seu efeito sobre os insetos-praga *Spodoptera frugiperda* e *Tenebrio molitor* (L.). O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação, empregando-se o aparelho de Clevenger modificado e, posteriormente, submetido à análise por CG-EM e CG-FID. A atividade inseticida foi avaliada pelos ensaios de deterrência e aplicação tópica em lagartas de *Spodoptera frugiperda* e de repelência e fumigação em adultos de *Tenebrio molitor* (L.). As análises cromatográficas revelaram como compostos majoritários do óleo essencial de *M. fragrans* os monoterpênoides terpin-4-ol (14,95%), sabineno (13,07%), γ -terpineno (11,22%) e β -pineno (9,30%) e em menores concentrações os fenilpropanóides metil-eugenol (2,44%), miristicina (3,25%) e safrol (1,92%), enquanto que para o óleo essencial de *S. microphylla*, o (E)-cariofileno (15,35%), os sesquiterpenos alcoólicos α -eudesmol (14,06%), β -eudesmol (8,74%) e γ -eudesmol (7,64%). Para a lagarta de *S. frugiperda*, foi observado que o óleo essencial de *S. microphylla* causou maior deterrência com CD_{50} 2,14 mg/mL, que o de *M. fragrans* com CD_{50} 3,03 mg/mL. No ensaio de aplicação tópica, foi observada mortalidade, contudo, em altas concentrações, a DL_{50} 271,79 μ g/lagarta para o óleo essencial de *M. fragrans*, e DL_{50} 350,56 μ g/lagarta para o de *S. microphylla*, com avaliação após as 24 horas. Para o coleóptero *T. molitor* o óleo essencial de *S. microphylla* foi mais tóxico, pelo teste

*Comitê Orientador: Maria das Graças Cardoso - UFLA (Orientadora), Jair Campos Moraes – UFLA e Luis Roberto Batista - UFLA (Co-orientadores)

de fumigação, com CL_{50} 6,33 $\mu\text{L}/\text{L}$ em relação ao óleo de *M. fragrans* com CL_{50} 8,22 $\mu\text{L}/\text{L}$, em todos os horários de avaliação. O óleo essencial *S. microphylla* causou alta repelência nas concentrações na faixa de (0,97 - 7,81 mg/mL), ao passo que, o óleo essencial de *M. fragrans* apresentou repelência em uma faixa maior de concentração (0,49 - 7,81 mg/mL) e, na concentração mais baixa, 0,12 mg/mL, ocorreu efeito atrativo.

2 ABSTRACT

LIMA, Rafaela Karin. Insecticidal activity of essential oils of *Myristica fragrans* Houtt. and *Salvia microphylla* H.B.K. in *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) and *Tenebrio molitor* L. 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae). In: _____. **Essential oils of *Myristica fragrans* Houtt. and of *Salvia microphylla* H.B.K.:** chemical characterization, biological and antioxidant activity. 2008. Cap. 2, p. 95-130. Thesis (Doctorate in Agrochemistry) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The plants produce a variety of compounds in the secondary metabolism, its are related to the interaction of the plant with the environment, for example, protection against insects, bacteria and fungi. The essential oils are a type of secondary metabolite of great importance, are increasingly studied and used together with the integrated pest management (IPM) because they present low toxicity to humans and the environment. This study aimed to characterize chemically essential oils of *Myristica fragrans* Houtt. and *Salvia microphylla* H.B.K. and to assess its effect on insect pests *Spodoptera frugiperda* and *Tenebrio molitor* (L.). The essential oil was obtained by hydrodistillation, using the apparatus of Clevenger modified, and subsequently submitted to the analysis by GC-MS and GC-DIC. Insecticidal activity was evaluated by the tests of feeding deterrence and topical application against larvae of *Spodoptera frugiperda* and, repellency and fumigation against adults of *Tenebrio molitor* (L.). The chromatographic analysis revealed as major compounds of essential oil of *M. fragrans*, the monoterpenoids terpin-4-ol (14.95%), sabinene (13.07%), γ -terpinene (11.22%) and β -pinene (9,30%) and lower concentrations the phenylpropanoids methyl-eugenol (2.44%), miristicin (3.25%) and safrole (1.92%), while for the essential oil of *S. microphylla* (E)-caryophyllene (15.35%), the oxygenated sesquiterpenes α -eudesmol (14.06%), β -eudesmol (8.74%) and γ -eudesmol (7.64%). For larvae of *S. frugiperda* was observed that the essential oil of *S. microphylla* caused greater feeding deterrence with DC_{50} 2.14 mg/ml, that of *M. fragrans* with DC_{50} 3.03 mg/ml. In the test of topical application, mortality was observed, however in high concentrations, the LD_{50} 271.79 μ g/larvae to the oil of *M. fragrans* and to the essential oil of *S. microphylla* of LD_{50} 350.56 μ g/larvae, with evaluation after 24 hours. For the coleopteron *T. molitor* the essential oil of *S. microphylla* was more toxic, the test of fumigation, with LC_{50} 6.33 μ l/l with respect to oil *M. fragrans* with LC_{50} 8.22

*Orienting Committee: Maria das Graças Cardoso – UFLA (Advisor), Jair Campos Moraes - UFLA and Luis Roberto Batista - UFLA (Co-advisor)

$\mu\text{l/l}$, at all hours of evaluation. The essential oil *S. microphylla* repellency caused high concentrations of (0.97 - 7.81 mg/ml), while the essential oil of *M. fragrans* showed repellency in a greater range of concentration of (0.49 - 7.81 mg/ml) and the lowest concentration 0.12 mg/ml was observed effect attractive.

3 INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, a busca por inseticidas naturais tem sido cada vez mais requisitada, devido à presença de substâncias extraídas de plantas apresentarem inúmeras vantagens quando comparada ao emprego de inseticidas sintéticos. Os inseticidas naturais são obtidos de recursos renováveis e são rapidamente degradados, não deixando resíduos em alimentos e no meio ambiente (Viegas Júnior, 2003).

Uma das classes de metabólicos secundários de plantas que vem se destacando são os óleos essenciais. Esses compostos podem causar interferência tóxica nas funções bioquímicas e fisiológicas de insetos herbívoros, sendo que a maioria deles age apenas como repelente. Para que uma substância seja um bom inseticida ou “inseticida ideal”, vários parâmetros devem ser levados em consideração, tais como a eficácia mesmo em baixas concentrações, ausência de toxicidade para mamíferos e animais superiores, ausência de fitotoxicidade, fácil obtenção, manipulação e aplicação, viabilidade econômica e não ter efeito cumulativo no homem e animais (Regnault-Roger, 1997; Isman, 2000).

Os óleos essenciais e vários terpenos, como o limoneno, timol, 1,8-cineol, entre outros, têm sido utilizados na agricultura contra fungos, bactérias, nematóides e insetos-praga, fazendo parte de várias formulações comercializadas no mundo (Ibrahim et al., 2001; Isman, 2006).

A lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada a principal praga do milho no Brasil, pois danifica plantas jovens e reduz em até 34% a produção de milho, podendo ser encontrada em outras culturas, como a da cana da cana-de-açúcar, do arroz e do algodoeiro. O cultivo de milho no período “safrinha” oferece boas condições para o seu desenvolvimento, devido à permanência de plantas na mesma área

durante o ano todo (Valicente & Cruz, 1991; Farias et al., 2001). Entre os principais métodos de seu controle, está o controle biológico e o químico, com o uso de inseticidas sintéticos (fosforados, carbamatos, piretróides, entre outros) os quais são tóxicos ao homem e ao meio ambiente. Também têm sido utilizados inseticidas reguladores de crescimento, como o *Lufenuron*, que atuam na síntese de quitina, alterando o processo de ecdise (Grützmacher et al., 2000; Gallo et al., 2002).

Por outro lado, na estocagem de produtos alimentícios, podem ocorrer problemas com a presença de insetos que reduzem a qualidade e quantidade desses produtos. O coleóptero *Tenebrio molitor* L., 1750 (Coleoptera: Tenebrionidae) é uma espécie, entre muitas, que pode ser encontrada. Ataca alimentos originados de grãos como farinhas, rações e macarrão, causando contaminação com seus fragmentos, resultando, assim, na perda e recusa desses produtos para comercialização (Garcia et al., 2003; Pinto Júnior, 2008). O controle desses insetos pode ser realizado por fumigantes à base de brometo de metila, (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Brasil, 2005). Todavia, vários problemas têm sido observados para esses inseticidas, como a carga residual que geram e a persistência no meio ambiente, bem como sua toxicidade e destruição que causam na camada de ozônio e na estratosfera terrestre (Ghini et al., 2002).

Devido aos vários problemas encontrados com o uso os inseticidas sintéticos e à busca incessante por novos produtos que possam substituí-los, com o presente trabalho objetivou-se caracterizar quimicamente os óleos essenciais de *Myristica fragrans* Houtt. e de *Salvia microphylla* H.B.K., bem como avaliar seu efeito sobre os insetos-praga *Spodoptera frugiperda* e *Tenebrio molitor*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Extração dos óleos essenciais

As sementes de noz-moscada (*M. fragrans*) foram obtidos em estabelecimento comercial (Lavras-MG), no mês de fevereiro 2007, enquanto que as folhas frescas de melhoral (*S. microphylla*) foram adquiridas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (MG), a uma latitude 21° 14' 43 sul e longitude 44° 59' 59 oeste, com altitude de 919 metros. Elas foram coletadas no período da manhã, em torno de 8 horas, no mês de junho 2007. A identificação botânica foi realizada no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, e sua exsicata encontra-se depositada no Herbário da UFLA (registro 23.014).

A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação, empregando-se o aparelho de Clevenger modificado, com duração de 2,5 horas, partindo de uma massa de 300,0 g de folhas frescas de melhoral e de 20,0 g de sementes trituradas de noz-moscada, sendo realizada em triplicata. O hidrolado obtido foi recolhido e particionado com diclorometano, separando-se a parte orgânica e aquosa. Descartou-se a fase aquosa, adicionando-se o sulfato de magnésio anidro à fase orgânica. Filtrou-se, e em seguida, levou-se a um rotaevaporador (BÜCHI ROTAVAPOR R114) para a obtenção do óleo essencial puro, o qual foi acondicionado em um frasco escuro e deixado sob refrigeração a 4 °C (Castro et al., 2006). Em paralelo foi realizado o teste de umidade, proporcionando o cálculo do rendimento dos óleos essenciais para a planta seca em p/p (Pimentel et al., 2006).

4.2 Identificação e quantificação dos constituintes

Os óleos essenciais foram submetidos à cromatografia em fase gasosa ,acoplada ao espectrômetro de massas, em equipamento Shimadzu, modelo CG-

17A, com detector seletivo de massa, modelo QP 5000. O equipamento foi operado nas seguintes condições: coluna cromatográfica utilizada foi do tipo capilar de sílica fundida, com fase ligada DB5, de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, utilizando hélio como gás carreador (1 mL/min). As temperaturas foram de 220°C no injetor e 240°C no detector. A temperatura do forno foi programada de 40 a 240°C, com acréscimo de 3°C a cada minuto. A identificação dos compostos foi feita por comparações dos espectros de massas, com os espectros existentes na biblioteca (Wiley 229) e pelo índice de Kovat's (Adams, 2001). A quantificação dos constituintes foi realizada utilizando um cromatógrafo gasoso Shimadzu, modelo 17A, equipado com detector de ionização de chama de hidrogênio (DIC) e coluna capilar DB5, de 30 cm de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio (2,2 mL/min); a taxa split 1:10 e o volume injetado de 1µL. A temperatura inicial da coluna foi de 45 até 240°C, sendo programada para ter acréscimos de 3°C a cada min, até atingir a temperatura máxima de 240°C. As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 220 e 240°C, respectivamente, com a pressão da coluna de 115 KPa. Foram realizadas três injeções de cada óleo essencial, obtendo-se a concentração média e o desvio-padrão para cada constituinte, sendo a quantificação obtida por normalização de área (%).

4.3 Ensaios toxicológicos

4.3.1 Obtenção dos insetos

Os insetos utilizados *T. molitor* e *S. frugiperda* foram provenientes da criação do Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Para os ensaios toxicológicos, foram selecionados insetos adultos, não sexados, de *T. molitor* com 2 a 5 dias de vida. A colônia desse coleóptero foi mantida, no escuro, em sala climatizada a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e UR de $60\pm 10\%$, em caixas de madeira de 70 cm x 40 cm x 20 cm forradas com farelo de trigo e aveia na proporção de 9:1, que serviram de alimento para o inseto e a caixa coberta com algodão.

As lagartas de *S. frugiperda* utilizadas foram selecionadas com 3° ínstar e 10 dias de vida (peso médio 35,0 mg), alimentadas com dieta artificial, conforme Kasten-Junior (1978). Essas foram mantidas em câmara climatizada regulada a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ com fotofase de 12 horas.

4.3.2 Ensaio de Deterrência em *S. frugiperda*

Neste ensaio, foi avaliada a redução alimentar da lagarta causada pelos óleos essenciais. Foram avaliadas as concentrações 0; 0,97; 1,95; 3,90; 7,81 e 15,62 mg óleo/mL de acetona. Inicialmente as lagartas foram individualizadas em tubos de ensaio de 4,0 cm de diâmetro e 12,0 cm de altura, em conjuntos de seis, e vedados com algodão, sendo que as lagartas ficaram quatro horas sem se alimentar para garantir que todo o sistema digestivo estivesse sem alimento. Para a montagem do experimento, secções foliares de milho cultivadas em estufa foram cortadas em áreas de $20,0 \text{ cm}^2$, pesadas e receberam 0,15 mL dos tratamentos. Após a total evaporação do solvente, as secções foliares tratadas foram oferecidas às lagartas previamente individualizadas. O consumo alimentar das lagartas foi determinado 5 horas após a realização do experimento, por pesagem das folhas, sendo avaliado 36 lagartas por concentração. Foi realizado um controle

O cálculo da porcentagem de redução alimentar (% RA) foi realizado utilizando a equação (1), de acordo com Reina et al. (2001);

$$\% \text{ RA} = [1 - (\text{consumo das lagartas em folhas tratadas} / \text{consumo das lagartas na testemunha}) * 100] \quad (\text{equação 1})$$

Calcularam-se no final do experimento a CD_{50} (concentração que causa 50 % de deterrência alimentar) em mg/mL.

4.3.3 Ensaio de Aplicação Tópica em *S. frugiperda*

Os óleos essenciais foram diluídos em acetona, obtendo-se as concentrações 0; 10,0; 50,0; 100,0; 250,0; 375,0; 500,0 e 625,0 mg/mL. O ensaio consistiu na aplicação 1,0 μL de cada concentração, com auxílio de uma microseringa (HAMILTON), na parte protorácica do inseto. As lagartas foram individualizadas em tubos de ensaio de 4 cm de diâmetro de 12 cm de altura, em conjuntos de seis, contendo a mesma dieta artificial da criação de manutenção e vedados com algodão. Foram realizadas seis repetições para cada concentração, sendo seis lagartas por repetição. Portanto, em 1,0 μL foram aplicados 0; 10,0; 50,0; 100,0; 250,0; 375,0; 500,0 e 625,0 μg de óleo essencial por lagarta, respectivamente. Avaliou-se a toxicidade aguda dos óleos essenciais, pela contagem de lagartas mortas após 24 e 48 horas da realização do experimento. Calcularam-se a DL_{50} e a DL_{90} (doses letais que causam a morte de 50 % e 90 % de insetos) em μg /lagarta (Hummelburnner & Isman, 2001).

4.3.4 Ensaio de Fumigação em *T. molitor*

Inicialmente os óleos essenciais foram diluídos em acetona e as concentrações avaliadas foram determinadas por ensaios preliminares, obtendo-se uma faixa concentração em que a mortalidade estivesse próxima de 0 até 100%. Com o óleo essencial de *M. fragrans*, a faixa de concentração avaliada foi de (3,0 a 11,0 $\mu\text{L/L}$ de ar) e com o de *S. microphylla* de (0,10 a 8,0 $\mu\text{L/L}$ de ar), utilizou-se também uma testemunha com apenas o solvente.

Para a montagem do experimento, as concentrações avaliadas foram aplicadas em secções de papel de filtro de 2,0 cm², com o auxílio de uma micropipeta e fixado em tampas de plástico de frascos de vidro com capacidade de 180,0 mL; cada frasco recebeu seis insetos adultos e 200,0 mg de farelo de trigo. Após a evaporação do solvente, os frascos foram devidamente fechados, possibilitando com este experimento a avaliação da toxicidade dos óleos essenciais por inalação (Sahaf et al., 2007).

A mortalidade dos insetos foi avaliada 24, 48 e 72 horas após a aplicação dos óleos, calculando-se a CL₅₀ e CL₉₀ (concentrações letais que causam a morte de 50 e 90 % de insetos), em µL de óleo essencial / L de ar. Foram realizadas seis repetições para cada concentração.

4.3.5 Ensaio de Repelência em *T. molitor*

Avaliou-se a repelência dos insetos com os óleos essenciais aplicados no alimento, nas concentrações de 0,12; 0,24; 0,49; 0,97; 1,95; 3,90 e 7,81 mg/mL acetona. Os insetos selecionados ficaram 24 horas sem se alimentar antes da montagem do experimento.

Inicialmente, foram pesados 200,00 mg de dieta (1:9 farelo de trigo/aveia) em recipientes redondos de plástico com 4,0 cm de diâmetro por 0,3 cm de altura, sendo dois desses colocados de lados opostos na borda de placas de Petri de 15 cm de diâmetro. Em seguida, um dos recipientes recebeu 0,5 mL das concentrações recém-preparadas de óleo essencial e o outro sem tratamento, serviu como testemunha. Após a evaporação total do solvente no centro da placa, foram liberados 10 insetos adultos de *T. molitor*.

A avaliação foi realizada 3 e 6 horas após a montagem do experimento por contagem do número de insetos que se alimentavam no recipiente com e sem tratamento. Foram realizadas quatro repetições por concentração. Para o cálculo

da porcentagem de repelência (%REP), foi utilizada a seguinte equação (2), de acordo com Ngoh et al. (1998):

$$\% \text{ REP} = 100 - (100 * \text{número de insetos nos tratamentos} / \text{número de insetos na testemunha} + \text{número de insetos nos tratamentos}) \quad (\text{equação 2})$$

4.3.6 Análise Estatística

Os dados da mortalidade dos ensaios foram contabilizados, e submetidos à análise estatística (regressão não-linear), sendo empregado o modelo Logístico disponível no pacote DRC (Analysis of Dose-Response Curves) (Ritz & Streibig, 2005), compilada pelo software R® (2008). A escolha foi baseada nas análises de resíduo, estimando-se os valores das concentrações letais que causam mortalidade em 50 e 90 % dos insetos (CL_{50} e CL_{90}) para o ensaio de fumigação; concentração de deterrência alimentar (CD_{50}) e as doses letais (DL_{50} e DL_{90}) para o ensaio de aplicação tópica, com intervalo de confiança (95%) pelo teste qui-quadrado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Óleos essenciais

Os compostos presentes no óleo essencial de *M. fragrans* estão descritos na Tabela 1. Os compostos majoritários encontrados são os monoterpenóides, terpin-4-ol (14,95%), sabineno (13,07%), γ -terpineno (11,22%) e β -pineno (9,30%) e, em menores concentrações, os fenilpropanóides, miristicina (3,25%) metil-eugenol (2,44%) e safrol (1,92%) e o rendimento do óleo essencial foi de 8,20%.

TABELA 1. Composição química do óleo essencial de sementes de *Myristica fragrans*

	Compostos	TR	IK	CM±D
1	α -tujeno	8,303	931	6,37 \pm 1,20
2	α -pineno	8,550	939	9,49 \pm 1,39
3	Sabineno	10,216	976	13,07 \pm 1,50
4	β -pineno	10,316	980	9,30 \pm 1,28
5	β -mirceno	11,039	991	1,72 \pm 0,31
6	α -felandreno	11,557	1005	0,95 \pm 0,22
7	delta-3-careno	11,830	1011	0,66 \pm 0,12
8	α -terpineno	12,133	1018	6,42 \pm 0,87
9	p-cimeno	12,475	1026	1,60 \pm 0,22
10	β -felandreno	12,693	1031	7,52 \pm 1,01
11	γ -terpineno	14,140	1062	11,22 \pm 1,30
12	hidrato de cis sabineno	14,505	1068	0,69 \pm 0,08
13	Terpinolene	15,539	1088	2,55 \pm 0,38
14	hidrato de trans-sabineno	15,990	1097	0,48 \pm 0,27
15	Linalol	16,146	1998	0,46 \pm 0,20
16	terpin-4-ol	19,875	1177	14,95 \pm 1,32
17	α -terpineol	20,489	1189	0,81 \pm 0,10
18	Safrol	25,131	1285	1,92 \pm 0,12
19	α -copaeno	29,250	1376	0,61 \pm 0,09
20	metil-eugenol	30,532	1401	2,44 \pm 0,21
21	(E) - cariofileno	31,174	1418	0,35 \pm 0,06
22	(E)- metil isoeugenol	34,541	1495	0,45 \pm 0,09
23	Miristicina	35,537	1520	3,25 \pm 0,13
24	Elemicina	37,002	1554	0,49 \pm 0,06
Total Identificado				97,77 %
Rendimento (p/p)				8,20 %

TR = tempo de retenção (minutos), IK= índice de Kovat's tabelado (Adams, 2001), CM (%) \pm D = concentração média (%) \pm desvio-padrão da média

Para o óleo essencial de *S. microphylla*, os compostos majoritários foram o (E)-cariofileno (15,35%), os sesquiterpenos alcoólicos α -eudesmol (14,06%), β -eudesmol (8,74%) e γ -eudesmol (7,64%), com o rendimento de 0,13 % de óleo essencial para a planta seca (Tabela 2).

TABELA 2. Composição química do óleo essencial de folhas de *Salvia microphylla*

	Compostos	TR	IK	CM±D
1	α-pineno	8,445	939	0,79 ± 0,14
2	Canfeno	9,020	953	0,94 ± 0,17
3	β-pineno	10,244	980	0,94 ± 0,10
4	β-felandreno	12,641	1031	2,81 ± 0,84
5	1,8-cineol	12,749	1033	4,49 ± 0,90
6	Cânfora	18,170	1143	2,58 ± 0,53
7	terpin-4-ol	19,799	1177	0,43 ± 0,08
8	acetato de isobornila	25,066	1285	4,94 ± 0,73
9	α-gurjuneno	30,759	1409	0,51 ± 0,06
10	(E)-cariofileno	31,088	1418	15,35 ± 1,32
11	aromadendreno	31,853	1439	2,68 ± 0,28
12	α-humuleno	32,449	1454	0,81 ± 0,03
13	alloaromadendreno	32,754	1461	1,34 ± 0,07
14	biciclogermacreno.	34,350	1494	6,17 ± 0,19
15	γ-cadineno	35,090	1513	0,89 ± 0,02
16	delta cadineno	35,487	1524	1,15 ± 0,01
17	Espatuleno	37,700	1576	0,42 ± 0,05
18	óxido de carofileno	37,857	1581	2,82 ± 2,16
19	Globulol	37,974	1583	3,24 ± 0,95
20	γ-eudesmol	39,892	1630	7,64 ± 0,91
21	β-eudesmol	40,557	1649	8,74 ± 1,13
22	α-eudesmol	40,827	1652	14,06 ± 1,84
Total Identificado				83,74 %
Rendimento (p/p)				0,13 %

TR = tempo de retenção (minutos), IK= índice de Kovat's tabelado (Adams, 2001), CM (%) ± D = concentração média (%) ± desvio-padrão da média

5.2 Ensaios toxicológicos

5.2.1 Ensaios de Deterrência e Aplicação Tópica em *S. frugiperda*

Pode-se observar que os óleos essenciais neste estudo causaram deterrência alimentar em *S. frugiperda* (Tabela 3). O óleo essencial de *S.*

microphylla causou maior deterrência, com CD_{50} 2,14 mg/mL, comparando-se ao de *M. fragrans*, com CD_{50} 3,03 mg/mL.

TABELA 3. Concentração de deterrência alimentar (CD_{50}) às 5 horas e intervalos de confiança (IC_{95}), para o ensaio de deterrência alimentar com folhas de milho tratadas com óleos essenciais de *Myristica fragrans* e de *Salvia microphylla* em lagartas de *Spodoptera frugiperda*

Óleo essencial	Parâmetros estimados			
	CD_{50} ($IC_{95\%}$) (mg/mL)	GL	X^2	n
<i>M. fragrans</i>	3,03 (1,85 - 4,94)	4	2,05	180
<i>S. microphylla</i>	2,41 (1,71 - 3,41)	5	4,43	180

GL = graus de liberdade, X^2 = qui-quadrado, n = número de indivíduos avaliados

A deterrência alimentar do óleo essencial de *M. fragrans* foi evidenciada por Huang et al. (1997) para as espécies *S. zeamais* e *T. castaneum*. No presente estudo, foram encontrados alguns fenilpropanóides nesse óleo essencial, como a miristicina (3,25%), metil-eugenol (2,44%), safrol (1,92%), elemicina (0,49%) e (E)-metil isoeugenol (0,45%). Na literatura, são relatados estudos que demonstraram a deterrência alimentar causada por esses compostos. Isso foi evidenciado por Huang et al. (1999), para o safrol e o isosafrol. Segundo esses, os referidos compostos apresentaram inibição para a enzima α -amilase in vivo, enquanto Huang et al. (2002) observaram o mesmo efeito para o eugenol, isoeugenol e o metil-eugenol, sobre os mesmos insetos *S. zeamais* e *T.*

castaneum, testados anteriormente. Esses pesquisadores comprovaram que o metil-eugenol foi o composto mais potente na redução do consumo alimentar de larvas de *T. castaneum* e que esses compostos, em combinação com a deltrametrina (piretróide sintético), podem potencializar seu uso. No mesmo ano, Harmatha & Nawrot (2002), avaliando a deterrência alimentar de lignanas e fenilpropanóides demonstraram que essa atividade foi afetada pelos grupos substituintes nas moléculas. Observaram que a presença de grupamentos polares hidroxilas (HO⁻) e glicosilas (C₆H₁₁O₆⁻) reduzem essa atividade, enquanto que grupos não-polares como metoxilas (CH₃O⁻) presentes no metil-eugenol, (E)-metil-isoeugenol e elemicina, metilenodioxilas (CH₂O₂⁻) presentes no safrol e na miristicina, aumentam a atividade dessas classes de compostos. Nos dados obtidos, nota-se que o resultado encontrado para o óleo essencial de *M. fragrans* corroboram com os descritos na literatura. Outros compostos como o terpin-4-ol (14,95%), sabineno (13,07%), γ -terpineno (11,22%) e β -pineno (9,30%) também foram encontrados com concentrações significativas; entretanto, infere-se que esse efeito tenha ocorrido principalmente devido à presença dos fenilpropanóides, anteriormente citados.

Nos óleos essenciais avaliados para a lagarta *S. frugiperda*, foram encontrados monoterpenos alcoólicos, os quais apresentaram efeito repelente/deterrente. Isso já havia sido evidenciado com o óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus* J.), tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e goiabeira (*Psidium guajava* L.), que apresentaram como um de seus constituintes majoritários o citronelol, timol e α -terpineol, respectivamente (Labinas et al., 2002; Castro et al., 2006; Lima, 2006).

A atividade deterrente alimentar de outros alcoóis encontrados em óleos essenciais já foi evidenciada para a lagarta *S. littoralis*. Hummelburnner & Isman (2001) encontraram a CD₅₀ 85,6; 115,1; 130,2 e 141,8 e $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para os compostos, timol, carvacrol, α -terpineol e eugenol, respectivamente. No presente

estudo, foi aplicado 0,150 mL em folhas de milho de 20 cm², portanto, as CD₅₀ foram de 16,05 e 22,72 µg/cm², para *S. microphylla* e *M. fragrans*, respectivamente. Posteriormente, Abdelgaleil et al. (2008) verificaram o mesmo efeito para dois compostos isolados do óleo essencial de *Artemisia judaica* L., o fenilpropanóide trans-cinamato de etila e a cetona monoterpênica (α , β insaturada) piperitona, com CD₅₀ de aproximadamente 0,075 mg/mL, para ambos os compostos.

No óleo essencial de *S. microphylla* foram encontrados muitos álcoois como os sesquiterpenos α -eudesmol (14,06%), β -eudesmol (8,74%), γ -eudesmol (7,64%), globulol (3,24%) e espatulenol (0,42%) como também os sesquiterpenos (E)-cariofileno (15,35%) e biciclogermacreno (6,17%), entre outros, que compõem um total de 65,82% do óleo analisado. Entre os sesquiterpenos alcoólicos que possuem atividade deterrente alimentar, citam-se o nerolidol e o geraniol para lagartas da mariposa de *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae) (Dorskotch et al., 1980), o cubebol para o gafanhoto *Locusta migratoria* (L.) (Orthoptera: Acrididae) (Wu et al., 2008), o bisaboleno e o silfineno para o besouro *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) (Gonzalez-Coloma et al., 1995) e o (E)-cariofileno para lagarta de *Thaumetopoea pityocampa* (Den. & Schiff.) (Lepidoptera: Thaumetopoeidae) (Petrakis et al., 2005).

A atividade de um composto pode variar, dependendo da espécie do inseto e do tipo de ensaio avaliado. Outro fator que deve ser levado em consideração é a interação entre os constituintes dos óleos essenciais; esses podem agir sinergisticamente aumentando sua atividade quando comparados com os compostos avaliados separadamente.

Pelo ensaio de aplicação tópica, os óleos essenciais apresentaram toxicidade aguda nas lagartas, ocasionando mortalidade, com DL₅₀ 271,79 µg/lagarta, para *M. fragrans* e DL₅₀ 350,56 µg/lagarta para *S. microphylla*,

avaliando-se 24 horas após da aplicação do óleo. Pode-se observar pelos dados na Tabela 4 que o óleo essencial de *M. fragrans* causou maior mortalidade nos dois horários de avaliação; após as primeiras 24 horas, as lagartas continuaram morrendo, obtendo-se um baixo valor da DL₅₀ (157,72 µg/lagarta).

TABELA 4. Doses letais (DL₅₀ e DL₉₀) às 24 e 48 horas e intervalos de confiança (IC₉₅), para o ensaio de aplicação tópica com óleos essenciais de *Myristica fragrans* e de *Salvia microphylla* em lagartas de *Spodoptera frugiperda*

Doses Letais	Óleo Essencial		Parâmetros estimados		
		<i>M. fragrans</i>	GL	X ²	n
DL₅₀ (IC 95%) µg/lagarta	24	271,79 (249,34 - 296,25)	90	77,935	288
	48	157,72 (125,80 - 197,74)	90	77,935	288
DL₉₀ (IC 95%) µg/lagarta	24	413,76 (354,65-482,70)	90	77,935	288
	48	484,00 (345,54-677,94)	90	77,935	288
		<i>S. microphylla</i>	GL	X ²	n
DL₅₀ (IC 95%) µg/lagarta	24	360,56 (318,19 - 408,57)	90	63,282	288
	48	350,46 (299,56 - 410,00)	90	63,282	288
DL₉₀ (IC 95%) µg/lagarta	24	625,12 (512,04-763,17)	90	63,282	288
	48	606,77 (494,15-745,07)	90	63,282	288

GL = graus de liberdade, X² = qui-quadrado, n = número de indivíduos avaliados

A toxicidade aguda de vários compostos presentes em óleos essenciais já foi demonstrada por outros pesquisadores, para a lagarta *S. litura*. Em trabalhos de Isman (2000), encontrou-se a DL₅₀ 130,4; 141,3 e 157,6 µg/lagarta para o terpinen-4-ol, α-terpineol e eugenol, respectivamente. Pesquisas de Hummelburnner & Isman (2001) demonstraram alta toxicidade para os compostos, timol, carvacrol, pulegona, (E)-anetol e citronelal, com DL₅₀ 25,6; 42,7; 51,6; 65,5 e 111,2 µg/lagarta, respectivamente, com avaliação após 24 horas. Outros, como a piperitona e o trans-cinamato de etila de 0,68 e 0,37 µg/lagarta, apresentaram maior toxicidade entre todos os compostos (Abdelgaleil et al., 2008). Observa-se que os resultados obtidos para o óleo essencial de *M. fragrans* estão próximos daqueles encontrados para essa lagarta do mesmo gênero e com os resultados apresentados por Srivastava et al. (2001), que comprovaram a toxicidade aguda da miristicina com DL₅₀ de 104,0 µg/lagarta para *Spilarctia obliqua* (Walker) (Lepidoptera: Arctiidae).

O óleo essencial de *M. fragrans* também apresentou toxicidade aguda (Huang et al., 1997), assim como os fenilpropanóides safrol e isosafrol, evidenciada por Huang et al. (1999), para *S. zeamais* e *T. castaneum*. Posteriormente, Huang et al. (2002) encontraram esse efeito para o eugenol, isoeugenol e o metil-eugenol sobre os mesmos insetos e constataram que esses compostos apresentam toxicidade similar para o gorgulho-do-milho *S. zeamais*, com DL₅₀ de 30 µg/mg inseto. Quando estes foram aplicados no besouro *T. castaneum*, observaram a seguinte ordem de toxicidade baseados na DL₅₀: isoeugenol > eugenol > metil-eugenol.

Vários outros compostos presentes nos óleos essenciais de *M. fragrans* e *S. microphylla* apresentaram toxicidade por contato para a barata *B. germanica*, como o α-terpineol, β-pineno, linalol, 1,8-cineol e cânfora. A relação entre estrutura química e atividade dos compostos, tal como grau de insaturação, tipos de função, entre outros, foram relatados por Jang et al. (2005). Esses autores

encontraram alta toxicidade para os compostos α -terpineol, (-)-tujona, linalol, 1,8-cineol, (-)-cânfora e (+)-carvona, com DL_{50} entre (0,08 a 0,18 mg/cm²). Recentemente, Jung et al. (2007), avaliando a atividade inseticida de alguns constituintes do extrato hexânico de *M. fragrans* contra as fêmeas adultas da mesma espécie, constataram que diferentes isômeros óticos também influenciam a toxicidade encontrada. A maior toxicidade foi demonstrada para (S)- β -pineno, com DL_{50} (0,06 mg/cm²), seguido da (R)-cânfora (0,10 mg/cm²) e α -terpineol (0,14 mg/cm²), enquanto que os isômeros (R)- β -pineno e (S)-cânfora apresentaram-se menos ativos, com DL_{50} de 0,12 mg/cm² e 0,13 mg/cm², respectivamente. Observa-se que esses valores foram menores aos encontrado para o óleo essencial de *S. microphylla*, pois a faixa de concentração em que ocorreu a mortalidade da *S. frugiperda* foi alta. Infere-se que isso tenha ocorrido devido ao fato desses compostos presentes nos óleos essenciais estudados apresentarem pouca afinidade com os compostos que compõem o tegumento desse inseto. Estudos de Kim et al. (2003) demonstraram a importância da relação entre a estrutura química e a atividade biológica dos compostos; para esses “quando maior a lipofilicidade, maior a penetração no tegumento do inseto”. O óleo essencial de *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) mostrou-se tóxico e capaz de provocar um desarranjo nos filamentos de actina e miosina no exoesqueleto de piolhos *P. humanus* (Cestari et al., 2004). Vários sintomas podem ser observados no inseto por contato com os compostos presentes nos óleos essenciais, como a neurotoxicidade, que resulta na agitação, hiperatividade e tremor seguido de paralisia, conhecido como “*knock-down*”. De acordo com Price & Berry (2006), alguns compostos podem bloquear a octopamina, um neurotransmissor de insetos que possui funções similares da adrenalina em vertebrados. Esse efeito já havia sido descrito por Ngoh et al. (1998), que observaram essa atividade para o safrol e isosafrol em *P. americana*. Outra enzima que pode ser afetada é a acetilcolinesterase. Savelev et al. (2003)

observaram que o óleo essencial de *Salvia lavandulaefolia* Vahl. inibiu essa enzima por complexas interações, como o sinergismo e o antagonismo entre seus constituintes.

5.2.2 Ensaio de Fumigação e Repelência em *T. molitor*

Os óleos essenciais foram tóxicos para *T. molitor* por inalação no ensaio de fumigação. Observa-se que o óleo essencial de *S. micrphylla* foi mais tóxico (CL₅₀ 6,33 µL/L) em todos os horários de avaliação, em relação ao óleo de *M. fragrans*, com CL₅₀ 8,22 µL/L (Tabela 5). Constatou-se também na avaliação às 48 horas o óleo essencial de *S. micrphylla*, causou alta mortalidade (CL₅₀ 2,80 µL/L) e às 72 horas a mortalidade foi praticamente a mesma (CL₅₀ 2,31 µL/L)

TABELA 5. Concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀) às 24, 48 e 72 horas e intervalos de confiança (IC₉₅), para o ensaio de fumigação com os óleos essenciais de *Myristica fragrans* e de *Salvia microphylla* em adultos de *Tenbrio molitor*

Concentrações letais	Óleo Essencial		Parâmetros estimados		
		<i>M. fragrans</i>	GL	X ²	n
CL ₅₀ (IC 95%) µL/L	24	8,22 (7,89-8,57)	57	70,059	324
	48	7,02 (6,55-7,53)	39	44,720	324
	72	7,07 (6,69-7,47)	45	53,831	324
CL ₉₀ (IC 95%) µL/L	24	9,51 (9,04-10,01)	57	70,059	324
	48	8,41 (7,79-9,09)	39	44,720	324
	72	8,19 (7,56-8,88)	45	53,831	324
		<i>S. microphylla</i>	GL	X ²	n
CL ₅₀ (IC 95%) µL/L	24	6,33 (6,04-6,63)	39	48,624	324
	48	2,80 (2,17-3,60)	39	48,736	324
	72	2,31 (1,72-3,10)	45	55,146	324
CL ₉₀ (IC 95%) µL/L	24	7,31 (6,87-7,78)	39	48,624	324
	48	5,76 (4,35-7,64)	39	48,736	324
	72	5,25 (4,01-6,88)	45	55,146	324

GL = graus de liberdade, X² = qui-quadrado, n = número de indivíduos avaliados

Entre os compostos presentes nos óleos essenciais considerados bons fumigantes, estão o 1,8 cineol, timol, carvacrol, borneol, cânfora, eugenol, 4-alil-anisol e linalol (Ojimekwe & Adler, 2000; Lee et al., 2003; Lee et al., 2004). De acordo com Lee et al. (2003), sendo os monoterpenos voláteis e lipofílicos, podem penetrar nas vias respiratórias dos insetos, agindo rapidamente e interferindo nas suas funções fisiológicas.

Lee et al. (2001), avaliando a atividade inseticida por fumigação de óleos essenciais de dezesseis plantas sobre a praga de grão armazenado *S. oryzae*, concluíram que o óleo essencial mais tóxico foi o de hortelã (*Mentha arvensis* L.), com CL₅₀ 45,5 µL/L, sendo composto principalmente de mentol (63,2%), mentona (13,1%) e limoneno (1,5%). Avaliando alguns compostos individualmente encontraram a CL₅₀ 12,7 µL/L para a mentona, 39,2 µL/L para o linalol e de 54,9 µL/L para o α-pineno. Estudos realizados por Choi et al. (2006), avaliando a toxicidade de vários monoterpenos contra adultos *Lycoriella mali* (Fitch) (Diptera: Sciaridae), encontraram alta toxicidade para o óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), com CL₅₀ 9,85 µL/L, ao passo que, Negahban et al. (2007), avaliando o óleo essencial de *Artemisia sieberi* Besser, tendo como constituintes majoritários a cânfora (54,7%), canfeno (11,7%) e o 1,8 cineol (9,9%), observaram que esse foi tóxico para as espécies *Callosobruchus maculatus* (Fab.) (Coleoptera: Bruchidae) e *S. oryzae* com CL₅₀ 1,45 e 3,86 µL/L, respectivamente. Constatou-se que os valores encontrados para as CL₅₀ dos óleos essenciais estudados corroboram com aqueles encontrados neste estudo.

Estudos realizados por Rozman et al. (2007) demonstraram que a toxicidade de um composto é dependente da espécie do inseto avaliada e tempo de exposição. Avaliando a toxicidade por fumigação de vários monoterpenos, como 1,8-cineol, cânfora, eugenol, linalol, carvacrol, timol, borneol, acetato de bornila e acetato de linalila, *S. oryzae*, *R. dominica* e *T. castaneum*. Constataram

que a mais susceptível foi *S. oryzae*, seguido da *R. dominica* e o *T. castaneum*. O 1,8-cineol, timol e borneol foram altamente eficazes contra *S. oryzae*, quando aplicado com 24 horas de exposição (0,1 mL/720 mL de volume). Para *R. dominica*, a cânfora e o linalol produziram 100% de mortalidade nas mesmas condições. Para o *T. castaneum*, nenhum composto atingiu mais de 20% de mortalidade após 24 horas de exposição, mesmo em doses mais elevadas (100 mL/720 mL de volume).

No óleo essencial de *S. microphylla*, foram encontrados vários sesquiterpenos alcoólicos, como o espatulenol, globulol, α -eudesmol, β -eudesmol e γ -eudesmol. Regnault-Roger & Hamraoui (1995), avaliando a atividade inseticida de monoterpenos oxigenados, para o caruncho *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae), demonstraram que eles apresentaram maior atividade do que aqueles formados por cadeias alifáticas

Algumas pesquisas já se evidenciaram atividade inseticida do óleo essencial de *M. fragrans* pelo teste de fumigação. Estudos de Chaubey (2008) mostrou que esse óleo, afetou o desenvolvimento de larvas do besouro *C. chinensis*, em adultos, ocasionou redução do número de ovos, bem como do potencial de oviposição, formação de pulpa e emergência. Nesse mesmo período, Shukla et al. (2008) evidenciaram toxicidade para adultos de *T. castaneum* e Park et al. (2008) demonstraram o mesmo efeito para larvas de *L. ingênua*, observaram que na concentração de 0,003 mg/mL de ar, causou 100% de mortalidade.

Poucos trabalhos foram desenvolvidos para o controle de *T. molitor*. Na classe dos terpenóides, foram avaliados os diterpenóides clerodanos, que ocasionaram atividade deterrente alimentar (Enriz et al., 1994). Posteriormente, Garcia et al. (2003), avaliando a atividade inseticida de sesquiterpenos isolados da espécie *Tessaria absinthioides* (Hook. et Arn.) DC. e de derivados semi-sintéticos sobre larvas deste inseto, observaram que o ácido tessárico causou a

maior porcentagem de mortalidade e o aldeído cístico causou alta repelência. Recentemente, Fazolin et al. (2007) demonstraram que os óleos essenciais das Piperáceas *Piper aduncum* L., *Piper hispidinervum* C. DC. e da Bignoniácea *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum apresentaram-se promissores para o controle *T. molitor*, nos testes de contato (superfície contaminada) com CL₅₀ 0,045; 0,033 e 1,515 mL/cm² e, para o teste de aplicação tópica, os valores da DL₅₀ 0,000025; 0,009 e 0,000015 mL/mg, respectivamente para os óleos essenciais.

Os óleos essenciais estudados causaram repelência em adultos de *T. molitor*. Observa-se, que o óleo essencial *S. microphylla* causou alta repelência nas concentrações na faixa de (0,97 - 7,81 mg/mL) e, em concentrações menores esse efeito não foi pronunciado (Tabela 6). O óleo essencial de *M. fragrans* apresentou repelência em uma faixa maior de concentração (0,49 - 7,81 mg/mL) e, na concentração mais baixa, ou seja, de 0,12 mg/mL foi observado o efeito atrativo. O mesmo fato foi observado por Hori (2003), que encontrou atividade repelente e atrativa para o mesmo inseto, utilizando o óleo essencial de *Litsea cubeba* L., constituído principalmente de citral. Esse mostrou-se repelente para o besouro *Lasioderma serricorne* (Fab.) (Coleoptera: Anobiidae) na dose de 1 µL, ao passo que, nas doses de 0,01 e 0,001 µL, foi atrativo.

TABELA 6. Porcentagem de repelência média (%PR) causada pelos óleos essenciais de *Myristica fragrans* e *Salvia microphylla* em adultos de *Tenebrio molitor*

Concentração mg/mL	<i>M. fragrans</i>		<i>S. microphylla</i>	
	3 horas	6 horas	3 horas	6 horas
7,81	97,5	82,5	97,5	82,5
3,90	95,0	85,0	100	90,0
1,95	90,0	75,0	97,5	95,0
0,97	92,5	82,5	97,5	97,5
0,49	85,0	85,0	47,5	57,5
0,24	42,5	25,0	47,5	55,0
0,12	25,0	17,5	42,5	40,0

A atividade inseticida de óleos essenciais pode ocorrer de diversas formas, sendo a atividade repelente o modo de ação mais comum (Isman, 2006). Já foi evidenciada a atividade repelente de óleos essenciais de plantas condimentares, como o de louro (*Laurus nobilis* L.), sobre a barata *P. americana* (Machado et al., 1995), o de canela (*Cinnamomum zeylanicum* L.), sobre o caruncho-do-feijão *Z. subfasciatus* (Oliveira & Vendramim, 1999) e o de hortelã (*Mentha piperita* L.) contra mosquitos vetores *Aedes aegypti* (L.) *Anopheles stephensi* (Liston) e *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae) (Ansari et al., 2000).

Em trabalhos de Ngoh et al. (1998), foi demonstrado que derivados benzênicos encontrados no óleo essencial de *M. fragrans* como o eugenol, metil-eugenol, isoeugenol, safrol e isosafrol, foram mais tóxicos e repelentes do que os monoterpenos limoneno, cineol e p-cimeno, para ninfas de baratas *P. americana*. Outros compostos repelentes foram o α -terpineno para *Culex pipiens pallens*

(Diptera: Culicidae) (Choi et al., 2002), (E)-cariofileno para larvas de *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera: Formicidae) (Wheeler et al., 2003), o (-) ácido citronílico, o guaiol e os isômeros α , β e γ -eudesmol, para cupins *Coptotermes formosanus* (Shiraki) (Isoptera: Rhinotermitidae) (Watanabe et al., 2005). Outros autores relatam que a atividade de um composto depende da espécie do inseto, por exemplo, o limoneno pode ser atrativo para a oviposição para *Prays citri* (Mill.) (Lepidoptera: Hyponomeutidae) e repelente para *Megastigmus pinus* (Parfitt) (Hymenoptera: Torymidae) (Ibrahim et al., 2001).

Os óleos essenciais apresentaram atividade inseticida pelo teste de deterrência alimentar para *S. frugiperda*, e para *T. molitor*, foi observado alto grau de repelência e toxicidade pelo ensaio de fumigação. Infere-se que os óleos essenciais de *M. fragrans* e *S. microphylla* apresentam-se promissores para serem utilizados com MIP (Manejo Integrado de Pragas) para o controle de insetos-praga, contudo, novos ensaios são necessários, para que viabilizem seu uso.

6 CONCLUSÕES

Os constituintes majoritários do óleo essencial de *M. fragrans* foram os monoterpenóides terpin-4-ol (14,95%), sabineno (13,07%), γ -terpineno (11,22%) e β -pineno (9,30%) e, em menores concentrações os fenilpropanóides metil-eugenol (2,44%), miristicina (3,25%) e safrol (1,92%).

Os constituintes majoritários do óleo essencial de *S. microphylla* foram o (E)-cariofileno (15,35%), os sesquiterpenos alcoólicos α -eudesmol (14,06%), β -eudesmol (8,74%) e γ -eudesmol (7,64%).

O óleo essencial de *S. microphylla* causou maior deterrência (CD_{50} 2,14 mg/mL), do que o óleo de *M. fragrans* (CD_{50} 3,03 mg/mL), para a lagarta de *S. frugiperda*.

O óleo essencial de *M. fragrans* apresentou maior efeito tóxico (DL_{50} 271,79 μ g/lagarta), pelo teste de aplicação tópica, que o óleo de *S. microphylla* (DL_{50} 350,56 μ g/lagarta).

O óleo essencial de *S. microphylla* (CL_{50} 6,33 μ L/L) foi mais tóxico, pelo teste de fumigação, em relação ao óleo de *M. fragrans* (CL_{50} 8,22 μ L/L) em todos os horários de avaliação, para adultos de *T. molitor*.

O óleo essencial *S. microphylla* foi repelente nas concentrações na faixa de (0,97 - 7,81 mg/mL), e o óleo essencial de *M. fragrans* em uma faixa maior de concentração de (0,49-7,81 mg/mL) e, na concentração mais baixa, ou seja, de 0,12 mg/mL foi observado o efeito atrativo, para adultos de *T. molitor*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELGALEIL, S.A.M.; ABBASSY, M.A.; BELAL, A.S.H.; RASOUL, M.A.A.A. Bioactivity of two major constituents isolated from the essential oil of *Artemisia judaica* L. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 99, n. 13, p. 5947-5950, Sept. 2008.

ADAMS, R.P. **Identification of essential oils components by gás chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing, 2001. 456 p.

ANSARI, M.A.; VASUDEVAN, P.; TANDON, M.; RAZDAN, R.K. Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (*Mentha piperita*) oil. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 71, n. 3, p. 267-271, July 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria n.º 49, 25 de abr. 2005. Submete à consulta pública, por um prazo de 30 (trinta dias), o Projeto de Instrução Normativa que Aprova o Regulamento para Credenciamento de Empresas Públicas e Privadas para prestação de serviços de Tratamentos Quarentenários, Fitossanitários e Procedimentos no Trânsito Internacional de Vegetais, seus produtos e subprodutos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, v. 142, n. 58, 27 mar. 2005. Seção 1.

CASTRO, D.P.; CARDOSO, M.G.; MORAES, J.C.; SANTOS, N.M.; BALIZA, D.P. Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 27-32, 2006.

CESTARI, I.M.; SARTI, S.J.; WAID, C.M; BRANCO-JUNIOR, A.C. Evaluation on the potential insecticide activity of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil against the head lice *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 505-807 Nov./Dec. 2004.

CHAUBEY, M.K. Fumigant toxicity of essential oils from some common spices against Pulse Beetle, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Oil Science**, Tokyo, v. 57, n. 3, p.1771-179, 2008.

CHOI, W.S.; PARK, B.S.; KU, S.K.; LEE, S.E. Repellent activities of essential Oils and monoterpenes against *Culex Pipiens Pallens*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 18, n. 4, p. 348-351, 2002.

CHOI, W.S.; PARK, B.S.; LEE, Y.H.; JANG, D.Y.; YOON, H.Y.; LEE, S.E. Fumigant toxicities of essential oils and monoterpenes against *Lycoriella mali* adults. **Crop Protection**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 398-401, Apr. 2006.

DOSKOTCH, R.W.; CHENG, H.Y.; ODELL, T.M.; GIRARD, L. Nerolidol: an antifeeding sesquiterpene alcohol for gypsy moth larvae from *Melaleuca leucadendron*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 6, n. 4, p. 845-851, 1980.

ENRIZ, R.D.; BALDONI H, E.; JÁUREGUI, M.; SOSA, E.; TONN, C.E. ; GIORDANO, O. Structure activity relationships of clerodane diterpenoids acting as antifeedant agents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, n. 12, p. 2958-2963, Dec. 1994.

FARIAS, P.R.S.; BARBOSA, J.C.; BUSOLI, A.C. Amostragem seqüencial com base na Lei de Taylor para levantamento de *Spodoptera frugiperda* na cultura do milho. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 395-399, abr./jun. 2001.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; FAZOLIN, M.; CATANI, V.; ALÉCIO, M.R.; LIMA, M.S. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* (L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p.113-120, jan./fev. 007.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. v. 10, 920 p.

GARCÍA, M.; SOSA, M.E.; DONADEL, O.J.; GIORDANO, O.S.; TONN, C.E. Effects of some sesquiterpenes on the stored-product insect *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, Mendoza, v. 62, n.3/4, p.17-26, 2003.

GHINI, R.; SCHOENMAKER, I.A.S.; BETTIOL, W. Solarização do solo e incorporação de fontes de matéria orgânica no controle de *Pythium* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 9, p. 1253-1261, set. 2002.

GONZALEZ-COLOMA, A.; REINA, M.; CABRERA, R.; CASTAÑERA, P.; GUTIERREZ, C. Antifeedant and toxic effects of sesquiterpenes from *Senecio palmensis* to colorado potato beetle. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 21, n. 9, p. 1255-1270, Sept. 1995.

GRÜTZMACHER, A.D.; MARTINS, J.F.S.; AZEVEDO, R.; GIOLO, F.P. Efeito de inseticidas e de tecnologias de aplicação no controle da lagarta-do-cartucho na cultura do milho no agroecossistema de várzea. In: REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DO MILHO, 45; REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DO SORGO, 28., 2000, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2000. p. 567-573.

HARMATHA, J.; NAWROT, J. Insect feeding deterrent activity of lignans and related phenylpropanoids with a methylenedioxyphenyl (piperonyl) structure moiety. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 104, n.1, p. 51-60, July 2002.

HORI, M. Repellency of essential oil against the cigarette beetle, *Lasioderma serricornis* (Fabricius) (Coleoptera: Anobiidae). **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 38, n. 4, p. 467-473, Nov. 2003.

HUANG, Y.; HO, S.H.; KINI, M. Bioactivities of safrole and isosafrole on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 92, n. 3, p. 676-683, June 1999.

HUANG, Y.; HO, S.H.; LEE, H.C.; YAP, Y.L. Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 403-412, 2002.

HUANG, Y.; TAN, J.; KINI, R.M.; HO, S.H. Toxic and antifeedant action of nutmeg oil against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus*. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 289-298, Oct. 1997.

HUMMELBRUNNER, A.; ISMAN, M.B. Acute, Sublethal, Antifeedant, and Synergistic Effects of Monoterpenoid Essential Oil Compounds on the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 2, p. 715-720, Feb. 2001.

IBRAHIM, M.A.; KAINULAINEN, P.; AFLATUNI, A.; TIILIKKALA, K.; HOLOPAINEN, J.K. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: With special reference to limonene and its suitability for control of insects pests. **Agricultural and Food Science in Finland**, Jokioinen, v. 10, n. 3, p. 243-259, 2001.

ISMAN, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 51, p. 45-66, 2006.

ISMAN, M.B. Plant essential oil for pest and disease management. **Crop Protection**, v. 19, Oxford, n. 8/10, p. 603-608, Sept./Dec. 2000.

JANG, Y.S.; YANG, Y.C.; CHOI, D.S.; AHN, Y.J. Vapor phase toxicity of Mmarjoram oil compounds and their related monoterpenoids to *Blattella germanica* (Orthoptera: Blattellidae). **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 20, p. 7892-7898, Oct. 2005.

JUNG, W.C.; JANG, Y.S.; HIEU, T.T.; LEE, C.K.; AHN, Y.J. Toxicity of *Myristica fragrans* Seed compounds against *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 44, n. 3, p. 524-529, May 2007.

KASTEN JUNIOR, P.; PRECETTI, A.A.C.M.; PARRA, J.R.P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 53, n. 1/2, p. 68-78, jun. 1978.

KIM, E.H.; KIM, H.K.; CHOI, D.H.; AHN, Y.J. Acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae). **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 38, n. 2, p. 261-266, May 2003.

LABINAS, M.A.; CROCOMO, W.B. Effect of java grass (*Cymbopogon winteranus*) essential oil on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1979) (Lepidoptera, Noctuidae). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 5, p.1401-1405, Sept./Oct. 2002.

LEE, B.H; ANNIS, P.C.; TUMAALII, F.; CHOI, W.S. Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1,8-cineole against 3 major stored-grain insects. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 553-564, 2004.

LEE, S.E.; LEE, B.H.; CHOI, W.S.; PARK, B.S.; KIM, J.G.; CAMPBELL, B.C. Fumigant toxicity of volatile natural products from korean spices and medicinal plants towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L). **Pest Management Science**, Sussex, v. 57, n. 6, p. 548-553, June 2001.

LEE, S.; PETERSON, C.J.; COATS, J.R. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 77-85, 2003.

LIMA, R.K. **Caracterização química e bioatividades do óleo essencial de folhas de goiabeira sobre a lagarta-do-cartucho do milho**. 2006. 56 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MACHADO, V.L.L.; PALMA, M.S.; OLIVEIRA, M. da C. Ação repelente de óleos essenciais da folha de louro (*Laurus nobilis* L.) em ninfas e adultos de *Periplaneta americana* (L.) (Blattaria: Blatitidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 13-20, mar./abr. 1995.

NEGAHBAN, M.; MOHARRAMIPOUR, S.; SEFIDKON, F. Fumigant toxicity of essential oil from *Artemisia sieberi* Besser against three stored-product. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 123-128, 2007.

NGOH, S.P.; CHOO, L.; PANG, F.Y.; HUANG, Y.; KINI, M.R.; HO, S.H. Insecticidal and repellent properties of nine volatile constituents of essential oils against the American cockroach, *Periplaneta americana* (L.). **Pesticide Science**, Sussex, v. 54, n. 3, p. 261-268, Nov. 1998.

ODALO, J.O.; OMOLO, M.O.; MALEBO, H.; ANGIRA, J.; NJERU, P.M.; NDIEGE, I.O.; HASSANALI, A. Repellency of essential oils of some plants from the kenyan coast against *Anopheles gambiae*. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 95, n. 3, p. 210-218, Sept. 2005.

OLIVEIRA, J.V.; VENDRAMIM, J.D. Repelência de óleos essenciais e pós vegetais sobre adultos de *Zabrotes subfasciatus* (Boh) (Coleóptera: Bruchidae) em sementes de feijoeiro. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 28, n. 3, p. 549-555, set. 1999.

OJIMELUKWE, P.C.; ADLER, C. Toxicity and repellent effects of eugenol, thymol, linalool, menthol and other pure compounds on *Dinoderus bifoveatus* (Coleoptera: Bostrichidae). **Journal of Sustainable Agriculture and the Environment**, Binghamton, v. 2, n. 1, p. 47-54, 2000.

PARK, I.K.; KIM, J.N.; LEE, Y.S.; LEE, S.G.; AHN, Y.J.; SHIN, S.C. Toxicity of Plant Essential Oils and Their Components Against *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 101, n. 1, p. 139-144, Jan. 2008.

PETRAKIS, P.V.; ROUSSIS, V.; PAPADIMITRIOU, D.; VAGIAS, C.; TSITSIMPIKOU, C. The effect of terpenoid extracts from 15 pine species on the feeding behavioural sequence of the late instars of the pine processionary caterpillar *Thaumetopoea pityocampa*. **Behavioural Processes**, Amsterdam, v. 69, n. 3, p. 303-322, June 2005.

PIMENTEL, F.A.; CARDOSO, M.G.; SALGADO, A.P.S.P.; AGUIAR, P.M., SILVA, V.F.; MORAIS, A.R.; NELSON, D.L. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 373-375, mar./abr. 2006.

PINTO JÚNIOR, A.R. Eficiência de terra de diatomáceas no controle de algumas pragas de milho armazenado a granel. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia de Uruguaiiana**, Uruguaiiana, v. 15, n. 1, p. 61-70, 2008.

PRICE, D.N.; BERRY, M.S. Comparison of effects of octopamine and insecticidal essential oils on activity in the nerve cord, foregut, and dorsal unpaired median neurons of cockroaches. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 309-319, Mar.2006.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2008. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso: 02/04/2008.

REGNAULT-ROGER, C; HAMRAOUI, B. Fumigant toxic activity and reproductive inhibition induced by monoterpenes on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera), a bruchid of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal Stored Product Research**, Oxford, v. 31, n. 4, p. 291-299, 1995.

REGNAULT-ROGER C. The potential of botanical essential oils for insect pest control. **Integrated Pest Management Reviews**, Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 25-34, Feb. 1997.

REINA, M.; GONZALÉZ-COLOMA, A.; GUTIÉRREZ, C.; CABRERA, R.; RODRÍGUEZ, M.L.; FAJARDO, V.; VILLARROEL, L. Defensive chemistry of *Senecio miser*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 64, n. 1, p. 6-11, Jan. 2001.

RITZ, C.; STREIBIG, J.C. Bioassay analysis using R. **Journal Statistical Software**, Los Angeles, v. 12, n. 5, p. 1-22, 2005.

ROZMAN, V.; KALINOVIC, I.; KORUNIC, Z. Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects. **Journal of Stored Products**, Oxford, v. 43, n. 4, p. 349-355, 2007.

SAHAF, B.Z.; MOHARRAMIPOUR, S.; MESHKATASADAT, MH. Chemical constituents and fumigant toxicity of essential oil from *Carum copticum* against two stored product beetles. **Insect Science**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 213-218, June 2007.

SAVELEV, S.; OKELLO, E.; PERRY, N.S.; WILKINS, R.M.; PERRY, E. Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Oxford, v. 75, n. 3, p. 661-668, June 2003.

SHUKLA, J.; TRIPATHI, S.P.; CHAUBEY, M.K. Toxicity of *Myristica fragrans* and *Illicium verum* essential oils against flour beetle *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Environmental, Agricultural Food Chemistry**, Oxford, v. 7, n. 7, p. 3059-3064, July 2008.

SRIVASTAVA, S.; GUPTA, M.M.; PRAJAPATI, V.; TRIPATHI, A.K.; KUMAR, S. Insecticidal activity of Myristicin from *Piper mullesua*, **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 39, n. 3, p. 226-229, June 2001.

VALICENTE, F.H.; CRUZ, I. **Controle biológico da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovírus**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 1991. 23 p. (EMBRAPA-CNPMS. Circular técnica, 15),

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 390-400, maio/jun. 2003.

WATANABE, Y.; MIHARA, R.; MITSUNAGA, T.; YOSHIMURA, T. Termite repellent sesquiterpenoids from *Callitris glaucophylla* heartwood. **Journal of Wood Science**, Tokyo, v. 51, n. 5, p. 514-519, 2005.

WHEELER, G.; MASSEY, L.M.; SOUTHWELL, I.A. Dietary influences on terpenoids sequestered by the biological control agent *Oxyops vitiosa*: effect of plant volatiles from different *Melaleuca quinquenervia* chemotypes and laboratory host species. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 29, n.1, p.189-208, Jan. 2003.

WU, B.; KASHIWAGI, T.; KURODA, I.; CHEN, X.H.; TEBAYASHI, S.; KIM, C.S. Antifeedants against *Locusta migratoria* from the sapanese Cedar, *Cryptomeria japonica* II. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 72, n. 2, p. 611-614, Feb. 2008.

ANEXOS

ANEXO A		Página
TABELA 1A	Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de <i>Myrsitica fragrans</i> e <i>Salvia microphylla</i> sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229.....	133
TABELA 2A	Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de <i>Myristica fragrans</i> e <i>Salvia microphylla</i> sobre <i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966.....	134
TABELA 3A	Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de <i>Myristica fragrans</i> e <i>Salvia microphylla</i> sobre <i>Salmonella Cholerasuis</i> ATCC 6539.....	135
TABELA 4A	Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de <i>Myristica fragrans</i> e <i>Salvia microphylla</i> sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25853.....	136
TABELA 5A	Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de <i>Myristica fragrans</i> e <i>Salvia microphylla</i> sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442.....	137
TABELA 6A	Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de <i>Myristica fragrans</i> e <i>Salvia microphylla</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.....	138
TABELA 7A	Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de <i>Myristica fragrans</i> e <i>Salvia</i>	

	<i>microphylla</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	139
TABELA 8A	Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de <i>Myristica fragrans</i> e <i>Salvia microphylla</i> sobre <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19117.....	140
TABELA 9A	Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de <i>Myristica fragrans</i> e <i>Salvia microphylla</i> sobre <i>Listeria innocua</i> ATCC 3309.....	141

TABELA 1A. Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Myrsitica fragrans* e *Salvia microphylla* sobre *Escherichia coli* ATCC 11229

Proporção (óleo essencial/etanol)	Concentração (mg/mL)	Halo de inibição (cm)	
		<i>M. fragrans</i>	<i>S. microphylla</i>
Testemunha	0	0 a	0
1:256	1,95	0 a	0
1:128	3,90	0 a	0
1:64	7,81	0 a	0
1:32	15,62	0 a	0
1:16	31,25	0 a	0
1:8	62,5	0 a	0
1:4	125	0 a	0
1:2	250	0,63 b	0
1:1	500	0,83 b	0
	CV (%)	53,83	0

Médias seguidas com a mesma letra na linha, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

TABELA 2A. Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Myristica fragrans* e *Salvia microphylla* sobre *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966

Proporção (óleo essencial/etanol)	Concentração (mg/mL)	Halo de inibição (cm)	
		<i>M. fragrans</i>	<i>S. microphylla</i>
Testemunha	0	0 a	0 a
1:256	1,95	0 a	0 a
1:128	3,90	0 a	0 a
1:64	7,81	0,50 b	0 a
1:32	15,62	0,56 bc	0 a
1:16	31,25	0,66 cd	0 a
1:8	62,5	0,70 d	0 a
1:4	125	0,90 e	0 a
1:2	250	1,00 e	0,5 b
1:1	500	1,00 e	0,8 c
	CV (%)	8,74	57,05

Médias seguidas com a mesma letra na linha, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

TABELA 3A. Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Myristica fragrans* e *Salvia microphylla* sobre *Salmonella Cholerasuis* ATCC 6539

Proporção (óleo essencial/etanol)	Concentração (mg/mL)	Halo de inibição (cm)	
		<i>M. fragrans</i>	<i>S. microphylla</i>
Testemunha	0	0 a	0 a
1:256	1,95	0 a	0 a
1:128	3,90	0,53b	0,50b
1:64	7,81	0,56bc	0,53b
1:32	15,62	0,80bcd	0,67 bc
1:16	31,25	0,87 bcd	0,87 cd
1:8	62,5	1,00 cd	1,00 d
1:4	125	0,97 bcd	1,40 e
1:2	250	1,07 d	1,50 e
1:1	500	1,00 cd	1,46 e
	CV (%)	24,71	10,52

Médias seguidas com a mesma letra na linha, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

TABELA 4A. Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Myristica fragrans* e *Salvia microphylla* sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853

Proporção (óleo essencial/etanol)	Concentração (mg/mL)	Halo de inibição (cm)	
		<i>M. fragrans</i>	<i>S. microphylla</i>
Testemunha	0	0 a	0 a
1:256	1,95	0 a	0 a
1:128	3,90	0 a	0,23ab
1:64	7,81	0 a	0,53 bc
1:32	15,62	0,50 b	0,53 bc
1:16	31,25	0,50 b	0,57 bc
1:8	62,5	0,50 b	0,60 bc
1:4	125	0,53 b	0,60 bc
1:2	250	0,57 bc	0,67 c
1:1	500	0,63 c	0,67 c
	CV (%)	10,26	36,93

Médias seguidas com a mesma letra na linha, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

TABELA 5A. Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Myristica fragrans* e *Salvia microphylla* sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442

Proporção (óleo essencial/etanol)	Concentração (mg/mL)	Halo de inibição (cm)	
		<i>M. fragrans</i>	<i>S. microphylla</i>
Testemunha	0	0 a	0 a
1:256	1,95	0 a	0 a
1:128	3,90	0 a	0,50 b
1:64	7,81	0,16	0,50 b
1:32	15,62	0,47	0,53 b
1:16	31,25	0,50	0,53 b
1:8	62,5	0,53	0,53 b
1:4	125	0,50	0,50 b
1:2	250	0,50	0,53 b
1:1	500	0,60	0,50 b
	CV (%)	30,46	9,05

Médias seguidas com a mesma letra na linha, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

TABELA 6A. Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Myristica fragrans* e *Salvia microphylla* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Proporção (óleo essencial/etanol)	Concentração (mg/mL)	Halo de inibição (cm)	
		<i>M. fragrans</i>	<i>S. microphylla</i>
Testemunha	0	0 a	0 a
1:256	1,95	0 a	0 a
1:128	3,90	0 a	0 a
1:64	7,81	0 a	0 a
1:32	15,62	0 a	0 a
1:16	31,25	0 a	0,60 b
1:8	62,5	0 a	0,97 b
1:4	125	0,60 b	1,00 b
1:2	250	0,80 c	1,03 b
1:1	500	0,90 c	1,00 b
	CV (%)	28,84	37,92

Médias seguidas com a mesma letra na linha, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

TABELA 7A. Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Myristica fragrans* e *Salvia microphylla* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Proporção (óleo essencial/etanol)	Concentração (mg/mL)	Halo de inibição (cm)	
		<i>M. fragrans</i>	<i>S. microphylla</i>
Testemunha	0	0 a	0 a
1:256	1,95	0 a	0 a
1:128	3,90	0 a	0,50b
1:64	7,81	0 a	0,53b
1:32	15,62	0 a	0,67 b
1:16	31,25	0 a	0,60 b
1:8	62,5	0 a	0,73 b
1:4	125	0,37 b	1,03 c
1:2	250	0,53 c	1,13 c
1:1	500	0,53 c	1,53 d
	CV (%)	60,3	13,93

Médias seguidas com a mesma letra na linha, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

TABELA 8A. Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Myristica fragrans* e *Salvia microphylla* sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 19117

Proporção (óleo essencial/etanol)	Concentração (mg/mL)	Halo de inibição (cm)	
		<i>M. fragrans</i>	<i>S. microphylla</i>
Testemunha	0	0 a	0 a
1:256	1,95	0 a	0 a
1:128	3,90	0 a	0,46 b
1:64	7,81	0 a	0,60 bc
1:32	15,62	0 a	0,66 bcd
1:16	31,25	0,16ab	0,80 cde
1:8	62,5	0,50 bc	0,86 def
1:4	125	0,60 c	0,93 ef
1:2	250	0,73 c	1,10 fg
1:1	500	0,83 c	1,26 g
	CV (%)	45,34	14,57

Médias seguidas com a mesma letra na linha, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

TABELA 9A. Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Myristica fragrans* e *Salvia microphylla* sobre *Listeria innocua* ATCC 3309

Proporção (óleo essencial/etanol)	Concentração (mg/mL)	Halo de inibição (cm)	
		<i>M. fragrans</i>	<i>S. microphylla</i>
Testemunha	0	0 a	0 a
1:256	1,95	0 a	0 a
1:128	3,90	0 a	0 a
1:64	7,81	0 a	0,47 b
1:32	15,62	0 a	0,57 bc
1:16	31,25	0 a	0,67 cd
1:8	62,5	0,47 b	0,77 de
1:4	125	0,47 b	0,80 e
1:2	250	0,70 c	0,83 ef
1:1	500	0,80 c	0,93 f
	CV (%)	26,10	9,32

Médias seguidas com a mesma letra na linha, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey