



**INFLUÊNCIA DE GENÓTIPOS, AMBIENTES
DE CULTIVO E VARIAÇÃO SAZONAL NO
TEOR E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Hyptis marruboides* EPLING E
SEU EFEITO SOBRE FORMIGAS SAÚVA-
LIMÃO**

PRISCILA PEREIRA BOTREL

2009

PRISCILA PEREIRA BOTREL

INFLUÊNCIA DE GENÓTIPOS, AMBIENTES DE CULTIVO E
VARIAÇÃO SAZONAL NO TEOR E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Hyptis marruboides* EPLING E SEU EFEITO
SOBRE FORMIGAS SAÚVA-LIMÃO

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

Orientador

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

BIBLIOTECA CENTRAL

U F L A

Nº CLAS. T 633.38387

BOT

Nº REGISTRO 240452

DATA 22/04/2009

LAVRAS

Uc. 68048

MINAS GERAIS - BRASIL

2009

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

Botrel, Priscila Pereira.

Influência de genótipos, ambientes de cultivo e variação sazonal no teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marruboides* Epling e seu efeito sobre formigas saúva-limão / Priscila Pereira Botrel. – Lavras : UFLA, 2009.

80 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Bibliografia.

1. Hortelã-do-campo. 2. Planta medicinal. 3. Óleo essencial. 4. Composição química. 5. Sazonalidade. 6. Condições de cultivo. 7. Genótipos. 8. Atividade inseticida. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.898

PRISCILA PEREIRA BOTREL

**INFLUÊNCIA DE GENÓTIPOS, AMBIENTES DE CULTIVO E
VARIAÇÃO SAZONAL NO TEOR E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Hyptis marrubioides* EPLING E SEU EFEITO
SOBRE FORMIGAS SAÚVA-LIMÃO**

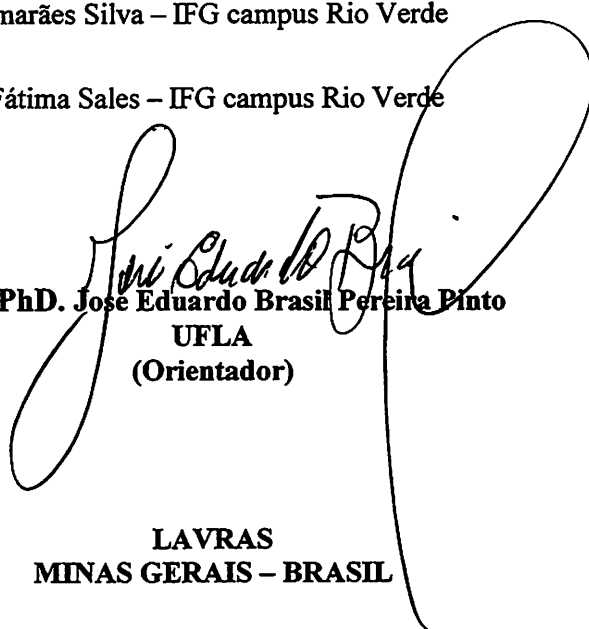
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 20 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. Geraldo Andrade Carvalho – UFLA

Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva – IFG campus Rio Verde

Prof.ª Dr.ª. Juliana de Fátima Sales – IFG campus Rio Verde



Prof. PhD. Jose Eduardo Brasil Pereira Pinto
UFLA
(Orientador)

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL**

A Deus, que sempre iluminou meus caminhos e minha vida agradeço pela
realização deste trabalho e a Ele

DEDICO

Aos meus pais, Sirlei Mendes Botrel e Maria Aparecida Pereira Botrel pelo
apoio e amor incondicional

À minha irmã Patrícia, pelo exemplo de vida, força de
vontade e carinho

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela forte presença em minha vida.

Aos meus pais Sirlei Mendes Botrel e Maria Aparecia Pereira Botrel pelo amor, força em todos os momentos e incentivo, a eles serei eternamente grata.

À minha irmã Patrícia Pereira Botrel e meu afilhado Riquelme que mesmo estando longe, parecem estar perto e sei que torcem muito por mim.

Ao meu noivo Felipe Campos Figueiredo, pelo amor, incentivo e exemplo profissional, tenho certeza que sem ele tudo seria mais difícil.

Em deferência à Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Departamento de Agricultura (DAG), assim como CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Prof. José Eduardo Brasil, meu orientador, pela amizade, apoio e pelo exemplo de competência, disciplina e determinação.

Ao meu co-orientador Geraldo Andrade Carvalho pela força, confiança, amizade e disponibilidade para ajudar a realizar este trabalho.

À Profª. Susan Kelly Vilela Bertolucci pela ajuda nas correções dos artigos científicos e análise química dos óleos.

Ao Prof. Pedro Henrique Ferri da UFG, pela realização das análises de composição química dos óleos essenciais.

Aos profissionais: técnicos e funcionários, Evaldo, Luizinho e Dico, por terem sido muito importantes para a realização deste trabalho, agradeço pela ajuda e amizade.

Aos amigos e colegas de departamento: Luciana, Carolina, Jorge, Andréia, Alisson, Roseane, Helen, Lucila, Fúlvia, Manuel, Andressa, Zélia. Aos

colegas do Laboratório de Estudos de Seletividade da Entomologia: Olinto e Andrea.

A aluna de iniciação científica Ana Clara de modo especial pela enorme ajuda na condução dos experimentos e amizade.

A minha sogra Graça e meu sogro Pereira, obrigado pela amizade, carinho e pelos finais de semana na roça.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO	03
2.1 Caracterização botânica do gênero <i>Hyptis</i>	03
2.2 Óleos essenciais.....	04
2.3 Fatores que influenciam a produção de princípios ativos	06
2.3.1 Genótipo	06
2.3.2 Condições de cultivo	07
2.3.3 Variação sazonal	08
2.4 Plantas inseticidas	09
2.5 Formiga cortadeira (<i>Atta sexdens rubropilosa</i> Forel)	11
2.6 Atividade tóxica de óleos essenciais sobre insetos.....	12
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
ARTIGO 1: Teor e composição química do óleo essencial de <i>Hyptis marrubioides</i> Epl. (Lamiaceae) em diferentes genótipos.....	21
1 Resumo.....	22
2 Abstract	23
3 Introdução	24
4 Material e Métodos.....	25
5 Resultados e Discussão	28
5.1 Teor do óleo essencial	28
5.2 Composição química do óleo essencial.....	30
6 Conclusões	32

7 Referências Bibliográficas	32
ARTIGO 2: Composição química e teor do óleo essencial de <i>Hyptis marruboides</i> Epl. cultivada em dois ambientes	35
1 Resumo.....	36
2 Abstract	37
3 Introdução	38
4 Material e Métodos.....	39
4.1 Condições de Cultivo	39
4.2 Extração do óleo essencial	40
4.3 Composição química do óleo essencial.....	41
5 Resultados e Discussão	42
6 Conclusões	49
7 Referências Bibliográficas	50
ARTIGO 3: Teor e composição química do óleo essencial de <i>Hyptis marruboides</i> Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade	53
1 Resumo.....	54
2 Abstract	55
3 Introdução	56
4 Material e Métodos.....	57
4.1 Local e condições climáticas do experimento.....	57
4.2 Propagação e cultivo	58
4.3 Coleta e preparo das amostras.....	58
4.4 Extração do óleo essencial	59
4.5 Composição química do óleo essencial.....	59
5 Resultados e Discussão	60
5.1 Teor de óleo essencial em folhas de <i>H. marruboides</i>	60
5.2 Análise da composição química do óleo essencial de <i>H. marruboides</i>	62
6 Conclusões	66

7 Referências Bibliográficas	67
ARTIGO 4: Efeito do óleo essencial de <i>Hyptis marrubioides</i> Epl. sobre <i>Atta sexdens rubropilosa</i> Forel (Hymenoptera: Formicidae).....	70
1 Resumo.....	70
2 Abstract	71
3 Introdução	72
4 Material e Métodos.....	73
5 Resultados e Discussão	74
6 Conclusões	78
7 Referências Bibliográficas	78

RESUMO

BOTREL, Priscila Pereira. **Influência de genótipos, ambientes de cultivo e variação sazonal no teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marruboides* Epling e seu efeito sobre formigas saúva-limão.** 2009. 80p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.¹

O óleo essencial no gênero *Hyptis* tem importância como fonte de constituintes bioativos, possuindo importantes efeitos biológicos, como atividades antimicrobianas, citotóxicas e inseticidas. *Hyptis marruboides* Epl., conhecida popularmente como hortelã-do-campo, é uma planta de uso medicinal com atividades contra infecções gastrointestinais, infecções de pele, dores e câimbras. Pesquisas com plantas medicinais ainda estão voltadas, preferencialmente, para o conhecimento de espécies que produzem fitofármacos desejados, ignorando-se os processos genéticos, ambientais e fitotécnicos que influenciam a produção desses compostos químicos. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar diferentes genótipos e partes da planta de *H. marruboides*, ambientes de cultivo e variação sazonal sobre o teor e a composição química do óleo essencial, bem como a atividade inseticida do óleo essencial sobre formigas cortadeiras (*Atta sexdens rubropilosa* Forel). Verificou-se que o maior teor de óleo essencial de *H. marruboides* foi observado na inflorescência do genótipo roxo e a composição do óleo essencial variou quantitativamente entre as partes das plantas analisadas e entre os genótipos. Plantas de *H. marruboides* cultivadas em campo apresentaram maior teor de óleo essencial comparado às plantas cultivadas em casa de vegetação. Na estação do verão as folhas das plantas de *H. marruboides* apresentaram maiores teores de óleo essencial e os componentes majoritários no óleo essencial foram os monoterpênoides α -tujona e β -tujona. A aplicação tópica do óleo essencial de *H. marruboides* apresentou atividade tóxica para formigas cortadeiras, e o tempo letal (TL₅₀) foi de 17 horas e 39 minutos na concentração de 38,34% de óleo essencial.

¹**Comitê Orientador:** PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto (Orientador) - UFLA, Dr. Geraldo Andrade Carvalho - UFLA (Co-orientador).

ABSTRACT

BOTREL, Priscila Pereira. Influence of genotypes, environments of cultivation and seasonal variation in the essential oil content and chemical composition of *Hyptis marrubioides* Epling and its effect on leaf-cutting ants. 2009. 80p. Dissertation (Master in Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras.¹

Essential oil in the genus *Hyptis* has importance as a source of bioactive constituents, possessing important biological effects such as antimicrobial, cytotoxic and insecticidal activities. *Hyptis marrubioides* Epl., known popularly as field mint is a plant of medicinal use with activities against gastrointestinal, skin infections, pains and cramps. Research works on medicinal plants are still preferentially turned to the knowledge of species which produce wished phytopharmics, ignoring the genetical, environmental and phytotechnical processes that influence the production of those chemical compounds. In this sense, the purpose of this work was the of evaluate different genotypes and parts of the plant of *H. marrubioides*, cultivation environment and seasonal variation on the content and chemical composition of essential oil, as well as the insecticidal activity on leaf-cutting ants (*Atta sexdens rubropilosa* Forel). It was found that the highest essential oil content in *H. marrubioides* was observed in the inflorescence of the purple genotype and the composition of the essential oil ranged quantitatively among the parts of the plant analyzed and among the genotypes. *H. marrubioides* plants cultivated in field presented higher essential oil content when compared to those cultured in greenhouse. In the summertime, the leaves of *H. marrubioides* showed higher essential oil contents and the major compounds in the essential oil were monoterpenoids α -thujone and β -thujone. The topical application of *H. marrubioides* essential oil presented toxic activity

¹**Guidance Committee:** PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Major Professor), Dr. Geraldo Andrade Carvalho – UFLA (Co-Major Professor).

to leaf-cutting ants and the lethal time (LT_{50}) was of 17 hours and 39 minutes at the concentration of 38.34% of essential oil.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem crescido muito o interesse por substâncias químicas extraídas de plantas ou microrganismos para a produção de medicamentos para o homem, além da fabricação de inseticidas e fungicidas, entre outros. Com o passar do tempo, medicamentos sintéticos foram perdendo espaço no mercado, devido ao seu alto custo, efeitos colaterais e contra-indicações.

Um problema grave na comercialização de fitoterápicos no Brasil ou na exportação é a falta do *status* de medicamento ético que lhe garanta eficácia, segurança e qualidade, padrões estes mensurados em bases científicas para a segurança do usuário (Siani & Gilbert, 2000). Muitos exemplos de plantas medicinais da biota brasileira poderiam ser citados, entretanto, a maioria das plantas medicinais comercializadas no Brasil é introduzida. Assim, as plantas medicinais endêmicas ainda são pouco conhecidas e se constituem num fascinante assunto de pesquisa acadêmica e de desenvolvimento científico (Pinto et al., 2002).

Dentre as famílias vegetais conhecidas e utilizadas popularmente e, portanto, com elevado potencial químico, rica em espécies aromáticas de grande importância econômica (Simões & Spitzer, 2000), encontra-se a família Lamiaceae com aproximadamente 264 gêneros descritos (USDA, 2007). *Hyptis marrubioides* Epl. é uma espécie pertencente a esta família, conhecida popularmente como hortelã do campo.

➤ O gênero *Hyptis* Jacq. inclui cerca de 300 espécies, de ampla ocorrência na América tropical (Willis, 1973; Harley, 1988). Este gênero apresenta uma grande importância como fonte de constituintes bioativos, possuindo importantes efeitos biológicos, como atividades antimicrobianas, citotóxicas e inseticidas (Kuhnt et al., 1995). Estas espécies são bastante aromáticas e são frequentemente

usadas no tratamento de infecções gastrointestinais, câimbras e dores, bem como no tratamento de infecções de pele (Corrêa, 1931).

Vários fatores têm que ser levados em consideração quando se deseja estudar o teor e a produção de compostos químicos ativos. A variabilidade na produção e teor dos óleos essenciais em Lamiaceae é conhecida por ser afetada por fatores ambientais tais como luz, disponibilidade de nutrientes, estações do ano, período do dia, ciclo e parte da planta, como também por fatores genéticos (Vieira, 2000).

São poucas as informações encontradas na literatura relatando estudos fitotécnicos com a espécie *H. marruboides*, relacionados à produção de princípios ativos. Os recursos fitotécnicos utilizados durante o processo de produção de plantas medicinais podem ser caracterizados como fontes de estímulo para produção de metabólitos secundários, que por certas vezes são capazes de causar estresse cujo efeito pode ser favorável ou não no que se refere ao acúmulo das substâncias de interesse (Corrêa Júnior et al., 2006). Assim, uma vez que o vegetal possui capacidade genética para produzir princípios ativos, a concentração pode ser alterada por fatores bióticos e abióticos do meio ambiente onde se encontra (Rodrigues, 2007).

As formigas cortadeiras são as principais pragas dos reflorestamentos brasileiros, pois atacam intensamente e constantemente as plantas em qualquer fase de seu desenvolvimento, cortando suas folhas, flores, brotos e ramos finos, que são carregados para o interior de seus ninhos sob o solo, o que torna difícil o seu controle. Elas representam mais de 75% dos custos e do tempo gasto no controle de pragas florestais (Zanetti et al., 2004).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar diferentes genótipos de *H. marruboides* e partes da planta fresca, ambientes de cultivo e variação sazonal sobre o teor e a composição química do óleo essencial, bem como a

atividade inseticida do óleo essencial sobre formigas cortadeiras (*Atta sexdens rubropilosa* Forel).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização botânica do gênero *Hyptis*

O gênero *Hyptis* apresenta uma grande diversidade morfológica, principalmente na região do Cerrado Brasileiro, com cerca de 300 a 400 espécies (Harley, 1988). Os óleos essenciais secretados neste gênero têm importante ação farmacológica, como anestésico, antiespasmódico, anti-inflamatório, além de abortivo em doses elevadas (Stasi et al., 1996).

Este gênero se caracteriza por apresentar plantas com inflorescências compostas, com flores dispostas em cimas formando panículas congestas, espigas, verticilos ou capítulos, ou dispostas em panículas amplas; as flores geralmente têm cálice 10-nervado com cinco dentes iguais ou desiguais, raramente obsoletos, geralmente acrescentado no fruto, e algumas vezes fortemente curvado ou inflado; corola bilabiada, 4-lobada, lobo superior emarginado, os dois lobos laterais expandidos e o lobo inferior formando um lábio cimbiforme, articulado na base, inicialmente ereto-patente, incluindo as anteras dos quatro estames declinados sob tensão para produzir um mecanismo explosivo de polinização; estigma 2-lobado, estilete ginobásico ou com estilopódio; os frutos são 4 núculas obovóide, algumas vezes achatadas, mucilaginosas ou não; são ervas, arbustos ou raramente árvores, geralmente com caules quadrangulares; folhas opostas, frequentemente portando glândulas com substâncias aromáticas (Harley, 1988).

H. marrubioides (Figura 1) é também conhecida como hortelã do campo e pertence à família Lamiaceae. As Lamiaceae compreendem uma família

pertencente à Ordem Tubiflorae (Lamiales), abrangendo cerca de 200 gêneros e, aproximadamente, 3.200 espécies, distribuídas em todo o mundo.



FIGURA 1 Plantas adultas (A) e inflorescências branca (B) e roxa (C) de *Hyptis marrubioides* cultivadas no campo.

2.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são substâncias produzidas pelo metabolismo secundário em pequenas quantidades em relação às substâncias produzidas pelo metabolismo primário, sendo responsáveis por funções nem sempre bem definidas. Difundem-se com facilidade a partir da evaporação, constituindo verdadeiro elo entre a fonte produtora e o meio ambiente. Apesar de terem sido considerados por muito tempo mero desvio de funções vitais da planta, os óleos essenciais são fundamentais para a inter-relação dos organismos, promovendo, assim, o equilíbrio entre os reinos vegetal e animal (Craveiro, 1981). Também denominados óleos etéreos ou essências, são misturas complexas e apresentam as características de volatilidade e baixa massa molecular, normalmente sendo líquidos de aparência oleosa, odoríferos, solúveis em solventes orgânicos e com solubilidade limitada em água (Simões & Spitzer, 2003).

Monoterpenos (C_{10}) e sesquiterpenos (C_{15}) voláteis de forma cíclica e acíclica são os componentes predominantes nos óleos essenciais. As essências possuem, geralmente, odor característico e auxiliam nas interações entre plantas, plantas/insetos e outros organismos, estando esses componentes presentes em quantidades variadas em diversos órgãos vegetais. De acordo com Sales et al. (2007), o principal grupo de constituintes na maioria das populações de *H. marruboides* estudando o óleo essencial de caules e folhas (frescos, secos e inteiros ou em pedaços) coletados em duas localidades do cerrado brasileiro, foram sesquiterpenos oxigenados (52,9-93,2%).

Os óleos essenciais são compostos sintetizados e armazenados em estruturas anatômicas chamadas de tricomas, que são extremamente especializadas (Balandrin et al., 1985; Gottlieb & Salatino, 1987; Taiz & Zeiger, 1991). Esses tricomas contêm enzimas, em suas células secretoras que auxiliam na síntese dos terpenos (Gershenzon et al., 1989).

Botrel et al. (2004) estudando níveis de sombreamento da planta e sua influência na anatomia foliar em *Hyptis marruboides*, verificaram a presença de quatro tipos de tricomas: simples pluricelulares, ramificados pluricelulares, capitados pluricelulares e capitados unicelulares.

Como estratégia de proteção, as espécies do gênero *Hyptis* apresentam adaptações como pêlos glandulíferos viscosos e pêlos tectores, distribuídos nos ramos das inflorescências, para impedir a ação das formigas (Harley, 1976; Barroso, 1991; Mota, 1998), que com muita frequência visitam essas plantas quando floridas.

Muitos estudos têm como objetivo principal aperfeiçoar os tratamentos culturais visando maximizar a produção de óleo essencial, como por exemplo, a determinação do melhor momento para a colheita, isto é, quando as plantas apresentam maior conteúdo de óleo essencial e seus constituintes mais importantes (Martins, 1998). Isso está associado ao fato de que a composição

dos metabólitos secundários nas plantas é resultado do balanço entre a sua formação e transformação que ocorrem durante o crescimento em decorrência principalmente de três fatores: genéticos, ambientais e das técnicas de cultivo (Castro et al., 2002).

2.3 Fatores que influenciam a produção de princípios ativos

2.3.1 Genótipo

Blank et al. (2006) citaram que pesquisas com plantas medicinais ainda estão voltadas, preferencialmente, para o conhecimento de espécies que produzem fitofármacos desejados, ignorando-se os processos genéticos, ambientais e fitotécnicos que influenciam a produção desses compostos químicos.

A composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo, geralmente, específica para um determinado órgão e característica para o seu estágio de desenvolvimento, mas as condições de cultivo, do ambiente e os tratos culturais adotados são responsáveis por grandes variações (Teuscher, 1990).

A constituição genética das plantas influencia a produção de determinados metabólitos, e diferentes variedades de espécies de plantas medicinais podem conter diferentes teores de óleo essencial. A hortelã, por exemplo, possui variedades que são mais ricas em óleo essencial, contendo alto teor de mentol (Basso et al., 1998; Sharma et al., 1992).

A variabilidade genética das plantas é expressa através dos chamados quimiotipos (QT) (Apel, 2001). Segundo alguns autores, QT é um termo aplicado a plantas de mesmo gênero e espécie, com a mesma aparência externa, mas que diferem, às vezes consideravelmente, em sua composição química. Esses QT usualmente ocorrem naturalmente em plantas silvestres, e podem resultar de polinização cruzada (Simões & Spitzer, 2000; Price & Price, 1999).

Di Leo Lira et al. (2003), afirmaram ter encontrado diferenças na composição química do óleo essencial de clones de *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton provenientes do Chile (dois clones) e Argentina (sete clones), mesmo entre clones oriundos do mesmo local. Estes autores concluíram que a espécie possui variabilidade química, que possibilita agrupar os clones estudados dentro de três quimiotipos: tipo 1,8-cineol, tipo metil heptenona e tipo citral (com composição química similar à encontrada na literatura – maioria dos clones). Devido a estas diferenças, é necessário realizar a identificação química dos compostos do óleo essencial, para verificar se o composto químico desejado se encontra nas amostras e, automaticamente, no clone de *A. triphylla* cultivado.

2.3.2 Condições de cultivo

Apesar de cada espécie ter se adaptado ao seu habitat, as plantas freqüentemente são capazes de existir em uma considerável faixa de temperatura. A faixa em que ocorrem as variações anuais, mensais e diárias na temperatura é um dos fatores que exerce maior influência em seu desenvolvimento, afetando, portanto, a produção de metabólitos secundários (Evans, 1996). No entanto, talvez pelo fato de a temperatura vir a ser, de modo geral, uma consequência de outros fatores, como altitude e sazonalidade, não existem muitos estudos sobre sua influência isoladamente na produção de metabólitos secundários.

O cultivo de plantas medicinais em regiões de temperatura mais elevada normalmente ocasiona maior volatilização dos óleos essenciais (Hertwig, 1991). Contudo, plantas de *Artemisia annua* L. submetidas a tratamentos de amplitudes térmicas de 18°/28°C e de 11°/20°C (dia/noite), não apresentaram diferenças de rendimento de artemisina por planta (Marchese & Rehder, 2001).

Outro fator é a disponibilidade hídrica. Sabe-se que a chuva contínua pode resultar na perda de substâncias hidrossolúveis das folhas e raízes por

lixiviação; isto se aplica a algumas plantas produtoras de alcalóides, glicosídeos e até mesmo óleos voláteis (Evans, 1996; Waterman & Mole, 1994).

Estudos mostram que a intensidade de luz é um fator que também influencia a concentração e/ou composição de outras classes de metabólitos secundários (Waterman & Mole, 1994), como terpenóides (Spring, 1987; Karousou et al., 1998; Yamaura et al., 1989), glicosídeos cianogênicos (Burns et al., 2002) e alcalóides (Höft et al., 1996; Hirata et al., 1996). Foi demonstrado, por exemplo, que no manjericão (*Ocimum basilicum*) e no tomilho (*Thymus vulgaris*), duas plantas utilizadas na medicina popular e como condimentos, o completo desenvolvimento de tricomas glandulares, onde os óleos essenciais são armazenados, é luz-dependente (Yamaura et al., 1989; Ioannidis et al., 2002).

2.3.3 Variação sazonal

As simples variações sazonais, refletidas no comportamento das plantas, certamente deslumbraram os primeiros observadores da natureza (Curti et al., 2003). O seu efeito no crescimento, desenvolvimento e teor de princípios ativos em plantas nada mais é do que a combinação dos fatores ambientais (vento, temperatura, umidade e luz) que ocorrem de maneira diversificada ao longo das quatro estações do ano (Pinto & Bertolucci, 2002).

Czepak (1998) relatou que o desenvolvimento inicial das plantas de *Mentha arvensis* L. é muito rápido na primavera e verão e proporciona os maiores rendimentos de óleo essencial (em L ha⁻¹). Por outro lado, durante o outono e inverno, houve um crescimento lento e observou-se um declínio acentuado no rendimento de óleo essencial, apesar desta não florescer. Em dias longos, o seu crescimento é intenso e, sob condições de dias frios e curtos, o crescimento vegetal estará comprometido.

Silva et al. (2000) concluíram, em trabalho realizado com *Ocimum basilicum* (manjericão), que épocas diferentes influenciam no teor de óleo

essencial, sendo que plantas colhidas em janeiro apresentaram maior teor de óleo.

Em canela (*Ocotea odorifera*) e guaçatonga (*Casearia sylvestris*), Castellani, et al (2003) estudando a produção de óleo essencial dessas duas espécies em função da época de colheita nas condições de Viçosa - MG, verificaram que para a canela não houve diferença estatística na produção de óleo essencial entre as colheitas realizadas na estação da primavera, verão e inverno sendo que no outono observou-se os menores valores na produção de óleo. Já para a guaçatonga os autores concluíram que o mais indicado é a execução da colheita no outono, ocorrendo nessa época uma maior produção de óleo essencial da espécie.

Parâmetros climáticos, tais como temperatura atmosférica e precipitação têm sido apontadas como fatores que influenciam a composição e conteúdo de óleo essencial em várias plantas aromáticas. De acordo com Taveira et al. (2003) os principais compostos identificados no óleo essencial de folhas e caules de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) foram 2-tridecanona, β -cariofileno, 2-pentadecanona, óxido de cariofileno e germacreno D e seus teores percentuais variaram com a estação, onde os maiores valores foram detectados principalmente na estação chuvosa.

2.4 Plantas inseticidas

Atualmente, os inseticidas naturais têm sido cada vez mais requisitados, apresentando inúmeras vantagens quando comparados ao emprego de inseticidas sintéticos, como por exemplo, são obtidos de recursos renováveis e são rapidamente degradados, não deixando resíduos em alimentos e no meio ambiente. O desenvolvimento destes compostos requer tempo e também um estudo sistematizado que preencha requisitos, tais como seletividade contra inimigos naturais, baixa toxicidade para mamíferos, biodegradabilidade e

ausência de fitotoxicidade, além dos requisitos econômicos para que sua produção em alta escala seja viável (Vieira et al., 2001).

Um dos grupos de substâncias conhecidas e ainda utilizado como inseticidas é o dos piretróides, originalmente extraídos de flores de crisântemos (Asteraceae). A grande vantagem de sua utilização é a sua baixa toxicidade aos mamíferos e a alta toxicidade aos insetos. Dentre os principais análogos dos piretróides estão os sintéticos ciclopropânicos deltametrina, fenvalerato e esfevalerato (Godfrey, 1994).

Dentre os terpenóides que apresentam atividade inseticida, encontram-se os tetranortriterpenos conhecidos como limonóides e são os maiores representantes desta classe de compostos inseticidas. Podem ser encontrados nas famílias Meliaceae, Rutaceae e Cneoraceae (Vieira et al., 2001; 2004).

Dentro da família Meliaceae, destaca-se a *Azadirachta indica* A. Juss, conhecida por “nim”, que é considerada uma das mais importantes devido a sua atividade sistêmica, eficiência em baixas concentrações e baixa toxicidade aos mamíferos (Gallo et al., 2002). O principal composto extraído dos frutos desta planta é a azadiractina, um limonóide que atua interferindo no funcionamento de glândulas endócrinas que controlam a metamorfose em insetos e também apresenta propriedade fago-inibidora (Vieira et al., 2001).

Outras meliáceas promissoras, no controle de diversas espécies de insetos, são as do gênero *Trichilia*, sendo o limonóide triquilina seu principal composto (Morais et al., 1981). Thomazini et al. (2000) testaram extratos aquosos de ramos e folhas de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) sobre a traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), e constataram que os extratos de folhas e de ramos prejudicaram o desenvolvimento do inseto, afetando, principalmente, a fase larval.

2.5 Formiga cortadeira (*Atta sexdens rubropilosa* Forel)

Todas as formigas estão agrupadas em uma única família Formicidae e restritas a 12 gêneros incluídos na tribo Attini onde foram reunidas às formigas que cultivam fungos em substratos vegetais. Nesta tribo estão incluídos os gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, conhecidas popularmente como saúvas e quenquéns, respectivamente (Bueno & Campos-Farinha et al., 1998; Campos-Farinha et al., 1995).

As formigas cortadeiras do gênero *Atta* estão incluídas entre os principais insetos-praga de cultivos no Brasil (Cruz et al., 1996). Esses insetos causam desfolha em vários tipos de plantas, como eucalipto, gramíneas e plantas nativas, utilizando as folhas para cultivar o fungo, que é empregado na sua alimentação (Zanuncio et al., 2002).

Os prejuízos causados pelas formigas cortadeiras não se limitam, apenas, aos gastos com controle e monitoramento, mas também à redução da produtividade do material lenhoso, ocasionado pela desfolha das plantas (Zanetti et al., 2000). Além disso, o ataque desses insetos pode deixar as plantas injuriadas menos resistentes e torná-las mais suscetíveis ao ataque de outras pragas e doenças (Ferreira, 1989).

As operárias de *Atta sexdens* são opacas, de coloração pardo-avermelhada, medindo no máximo 11 mm de comprimento; a cabeça e o abdome são pilosos. Esmagando-se essas formigas, percebe-se um cheiro forte de limão; daí o nome de saúva-limão. Cortam folhas de dicotiledôneas, ocorrendo em todo o Brasil, com exceção da caatinga do Nordeste (Gallo et al., 2002).

Há muitas teorias a respeito do comportamento forrageiro das formigas cortadeiras ou aplicáveis a elas. Entre outras podemos citar, embora não estando

ligadas diretamente a ação das formigas: não preferência, antibiose e tolerância de Painter (1951) e dieta ótima de MacArthur & Pianka (1966).

A teoria da discriminação dualística estabelece que a seleção da planta depende da habilidade do inseto em escolher a folha certa o que ocorre em função de estímulos nutritivos e a presença de substâncias secundárias. Alcalóides, terpenóides, óleos essenciais e glicosídeos, são substâncias que desencadeiam processos comportamentais distintos, facilitando ou dificultando a preferência alimentar das formigas. A escolha da planta, o início da alimentação e a sua continuidade dependem da ação destes produtos.

As formigas cortadeiras têm sido controladas, principalmente, utilizando-se inseticidas de origem sintética, os quais agem indiscriminadamente contra todos os insetos, inclusive os benéficos.

A associação mutualística entre a formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* (saúva limão) e o fungo *Leucoagaricus gongilophorus* é muito forte e existe uma total dependência entre ambos (Cruz & Batista Filho, 1993; Bononi et al., 1981).

Nesse contexto, a utilização de produtos naturais de origem vegetal com ação tóxica às formigas e/ou ao fungo simbiote é uma perspectiva na busca de um método eficaz de controle desta praga.

2.6 Atividade tóxica de óleos essenciais sobre insetos

Os óleos voláteis possuem uma variada série de ações biológicas (Dey & Harbone, 1997), sendo esta uma das justificativas para se aprofundar os estudos em óleos no combate de pragas. Compostos orgânicos bioativos produzidos por vegetais incluem repelentes, inibidores de crescimento, esterilizantes e toxinas, que formam uma vasta defesa química contra insetos e microrganismos invasores e apresentam-se como uma estratégia viável para a redução das populações de insetos (Cavalcante et al., 2006).

Uma planta ou variedade possui diversos mecanismos para resistir ao ataque de uma praga. Esses meios constituem os tipos de resistência. Painter (1951) propôs a classificação de resistência em três tipos: não-preferência para alimentação, oviposição ou abrigo (antixenose); antibiose (efeito adverso da planta sobre o metabolismo do inseto) e tolerância (regeneração ou capacidade de suportar o ataque do inseto).

Uma espécie de eucalipto, *Eucalyptus grandis* foi uma das menos consumidas em testes de preferência pela formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* a diferentes espécies florestais (Peres Filho et al., 2002). Os autores, porém, não investigaram as causas da não-preferência das formigas por essa espécie de eucalipto.

Algumas das hipóteses que tentam explicar a seletividade de plantas pelas formigas podem ser sugeridas para explicar as diferenças de preferência entre *Eucalyptus cloeziana* e as outras espécies estudadas. Talvez haja algum composto secundário repelente presente no óleo essencial de *E. cloeziana* que não esteja presente nos óleos essenciais das outras espécies de eucalipto, visto que as folhas de algumas espécies de eucaliptos são ricas nessas substâncias (Penfold & Willis, 1961). Os óleos essenciais são ricos em terpenóides que podem ser fortemente repelentes às formigas da tribo Attini, conforme demonstrado por Marsaro Júnior et al. (2004). Esses autores observaram alterações de comportamento em operárias de *Atta sexdens rubropilosa* quando as formigas foram expostas ao óleo essencial de *Eucalyptus maculata*. Além disso, os extratos hexânicos dessa espécie de eucalipto revelaram alguns terpenóides, especialmente o β -eudesmol, como os responsáveis pelas alterações de comportamento.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APEL, M. A. Óleos voláteis e espécies da Subtribo Eugeniinae (Myrtaceae): composição química e atividades antimicrobiana e antiinflamatória. 2001. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BALANDRIN, M. F.; KLOCKE, J. A.; WURTELE, E. S.; BOLLINGER, W. H. Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. *Science*, Washington, v. 228, n. 4704, p. 1154-1160, 1985.
- BARROSO, G. M. *Sistemática de angiospermas do Brasil*, 3.ed. Viçosa, MG: UFV, 1991. 326 p.
- BASSO, F.; PISANTE, M.; BASSO, B. Agronomical aspects of officinal plant cultivation. *Phytotherapy Research*, Sussey, v. 12, p. 131-134, 1998. Suppl.
- BLANK, A. F.; OLIVEIRA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; FAQUIN, V. Efeitos da adubação química e da calagem na nutrição de melissa e hortelã-pimenta. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 24, n. 2, p. 195-198, abr./jun. 2006.
- BONONI, V. L.; AUTUORI, M.; ROCHA, M. B. L. *Leucoagaricus gongilophorus* (Moller) Heim, o fungo do formigueiro de *Atta sexdens rubropilosa* Forel. *Rickia*, São Paulo, v. 9, p. 93-97, 1981.
- BOTREL, P. P.; PINTO, J. E. B. P.; SALES, J. F.; CASTRO, E. M.; FIGUEIREDO, F. C. Anatomia foliar com ênfase na frequência de estômatos e nos tricomas de plantas jovens de hortelã-do-campo submetidas a diferentes níveis de sombreamento. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFLA - CICESAL, 17., 2004, Lavras *Anais...* Lavras: CNPq/UFLA/FAPEMIG, 2004. 1 CD-ROM.
- BUENO, O. C.; CAMPOS-FARINHA, A. E. C. Formigas urbanas: comportamento das espécies que invadem as cidades brasileiras. *Vetores & Pragas*, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p. 13-16, 1998.
- BURNS, A. E.; Gleadow, R. M.; Woodrow, I. E.; *Oecologia* 2002, 133, 288.

CAMPOS-FARINHA, A. E. C.; JUSTI, J.; BERGMANN, E. C.; ZORZENON, F. J.; RODRIGUES NETTO, S. M. Formigas Urbanas. **Boletim Técnico Instituto Biológico**, Campinas, n. 1, p. 5-21, 1995.

CASTELLANI, D. C.; CASALI, V. W. D.; CECON P. R.; CARDOSO, C. A.; MARQUES, V. B. Produção de óleo essencial em canela (*Ocotea Odorifera*) e guaçatonga (*Casearina sylvestris*) em função da época de colheita. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 2., 2003, Campinas. **Anais...** Campinas: IAC, 2003.

CASTRO, D. M.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M. Produção de biomassa e composição de substâncias químicas de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britt & Wilson de folhas em diferentes partes da planta e diferentes estações do ano. **Acta-Horticulturae**, Amsterdam, n. 569, p. 111-115. São Paulo, 2002.

CAVALCANTE, G. M., MOREIRA, A. F. C., VASCONCELOS, S. D. Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca-branca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 1, p. 9-14. jan, 2006.

CORRÊA JÚNIOR, C.; SCHEFFER, M.C.; MING, L.C. **Cultivo agroecológico de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Brasília, DF: Ministério do Desenvolvimento Agrário, 2006. 76 p.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1931.

CRAVEIRO, A. A. **Óleos de plantas do Nordeste**. Fortaleza: UFC, 1981. 210 p.

CRUZ, A. P.; ZANUNCIO, J. C.; ZANETTI, R.; GOMES, O. S. Eficiência de iscas granuladas à base de sulfluramida e de clorpirifós no controle de *Atta sexdens sexdens* (Hymenoptera: Formicidae), no trópico úmido. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 26, n. 3, p. 145-150, set. 1996.

CRUZ, B. P. B.; BATISTA FILHO, A. Manifestação da forma perfeita de *Leucoagaricus gongilophorus* (Moller) Heim em saubeiro artificial de *Atta sexdens rubropilosa* Forel. **Arquivo do Instituto Biológico**, Campinas, v. 60 n. 1/2, p. 66-69, 1993.

CURTI, M.; CZEPAK, M. P.; MARTINS, J. M. Estruturação do jardim didático de plantas aromáticas, medicinais e condimentares, ocorrentes em Marechal Cândido Rondon-PR. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PLANTAS

MEDICINAIS: DIAGNÓSTICO E PERSPECTIVAS, 2., 2003, Campinas.
Anais... Campinas: Instituto Agronômico, 2003. p.62.

DEY, P.M.; HARBONE, J. B. **Plant biochemistry**. London: Academic, 1997.
529p.

DI LEO LIRA, P.; GIL, A.; BANDONI, A.; BAREN, C. van. *Aloysia citriodora*: presença de quimiotipos em exemplares provenientes de Argentina y Chile. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS: DIAGNÓSTICO E PERSPECTIVAS, 2., 2003, CAMPINAS. **Anais...** Campinas: Instituto Agronômico, 2003. p. 150.

DI STASI, L.C.; LIMA, C. A. H.; MARIOT, A.; PORTILHO, W. G.; REIS, M. S. **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996.

EVANS, W. C. **Trease and evans' pharmacognosy**. 14th ed. London: WB Saunders Company, 1996. cap. 7.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa, MG: SIF, 1989. 570 p.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, 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. 920 p.

GERSHENZON, J.; MAFFEI, M.; CROTEAU, R. Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of spearmint (*Menta spicata*). **Plant physiology**, Rockville, v.89, n.4, p.1351-1357, Apr. 1989.

GODFREY, C. R. A. **Agrochemical from natural products**. New York: Marcel Dekker, 1994.

GOTTLIEB, O. R.; SALATINO, A. Função e evolução de óleos essenciais e de suas estruturas secretoras. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 39, n. 8, p. 707-716, ago. 1987.

HARLEY, R. M. A review of Eriope and Eriopidian (Labiatae). **Hooker's Icones Plantarum**, Richmond, v. 38, n. 3, 1976.

HARLEY, R.M. Evolution and distribution of *Eriope* (Labiatae) and its relatives in Brasil. In: WORKSHOP ON NEOTROPICAL DISTRIBUTION PATTERNS, 1988, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1988. p. 71-80.

HERTWIG, I. F. von. **Plantas aromáticas e medicinais: plantio, colheita, secagem, comercialização.** 2. ed. São Paulo: Ícone, 1991. 414 p.

HIRATA, K.; ASADA, M.; YATANI, E.; MIYAMOTO, K.; MIURA, Y.; Effects of near-ultraviolet light on alkaloid production in catharanthus-roseus plants. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 59, n. 1, p. 46-50, Feb. 1993.

HÖFT, M.; VERPOORTE, R.; BECK, E. Growth and alkaloid contents in leaves of tabernaemontana pachysiphon *Stapf* (Apocynaceae) as influenced by light intensity, waxes and nutrient supply. **Oecologia**, New York, v. 107, n. 2, p. 160-169, July 1996.

IOANNIDIS, D.; BONNER, L.; JOHNSON, C. B. UV-B is required for normal development of oil glands in *Ocimum basilicum* L. (Sweet basil). **Annals of Botany**, London, v. 90, n. 4, p. 453-460, Oct. 2002.

KAROUSOU, R.; GRAMMATIKOPOULOS, G.; LANARAS, T.; MANETAS, Y.; KOKKINI, S. Effects of enhanced UV-B radiation of *Mentha spicata* essential oils. **Phytochemistry**, Oxford, v. 49, n. 8, p. 2273-2277, Dec. 1998.

KUHNT, T.M.; PROBSTLE, A.; RIMPLER, H.; BAUER, R.; HEINRICH, M. Biological and pharmacological activities and further constituents of *Hyptis verticillata*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 61, n. 3, p. 227-232, 1995.

MACARTHUR, R. H.; PIANKA, E. R. On optimal use of patchy environment. **The American Naturalist**, Chicago, v. 100, n. 916, p. 603-609, 1966.

MARCHESE, J. A.; REHDER, V. L. G. Influência da temperatura na produção de artemisina em *Artemisia annua* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 4, n. 1, p. 89-93, 2001.

MARSARO JÚNIOR, A. L.; SOUZA, R. C.; DELLA LUCIA, T. M. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. ; VIEIRA, P. C. Behavioral changes in workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* induced by chemical components of *Eucalyptus maculata* leaves. **Journal of Chemical Ecology**, Heidelberg, v. 30, n. 9, p. 1771-1780, Sept. 2004.

- MARTINS, E. M. Estudos em *Ocimum selloi* Benth.: isozimas, morfologia e óleo essencial. In: MING, L. C. (Org.). **Plantas medicinais, aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agrônômica**. Botucatu: UNESP, 1998. p. 97-125.
- MORAIS, A. A. de; REZENDE, C. M. A. da M.; VON BÜLOW; MOURÃO, J. C.; NAKATANI, M.; JAMES, J. C.; NAKANISHI, K. Isolation and structure of trichilins, antifeedants against the southern army worm. **Journal of American Chemistry Society**, Washington, v. 103, n. 5, p. 1228-1230, 1981.
- MOTA, A. S. F. **Diferentes estratégias adaptativas de espécies invasoras e do cerrado do gênero *Hyptis* Jacq. (Labiatae)**. 1998. 117 p. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- PAINTER, R. H. **Insect resistance in crop plants**. New York: McMillan, 1951. 520p.
- PENFOLD A. R.; WILLIS J. L. **The eucalypts**. New York: Interscience, 1961. New York.
- PERES FILHO, O.; DORVAL, A.; BERTI FILHO, E. Preferência de saúva limão, *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908, para diferentes espécies florestais em condições de laboratório. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 12, n. 2, p. 1-8, abr./jun. 2002.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.
- PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Cultivo e processamento de plantas medicinais**. Lavras: UFLA, 2002. p.47.
- PRICE, S.; PRICE, L. **Aromaterapy for health professionals**. New York: Churchill Livingstone, 1999.
- RODRIGUES, V. E. G. **Etnobotânica e florística de plantas medicinais nativas de remanescentes de floresta estacional semidecidual na região do Alto do Rio Grande, MG**. 2007. 149 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- SALES, J.F.; PINTO, J. E. B. P.; BOTREL, P. P.; OLIVEIRA, C. B. A.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; SERAPHIN, J. C. Composition and chemical variability in

- the essential oil of *Hyptis marrubioides* Epl. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 19, n. 6, p. 552-556, Nov./Dec. 2007.
- SHARMA, S.; TYAGI, B. R.; NAQVI, A. A.; THAKUR, R. S. Stability of essential oil yield and quality characters in Japanese mint (*Mentha arvensis* L.) under varied environmental conditions. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 4, p. 411-416, 1992.
- SIANI, A.C.; GILBERT, B. Far-Manguinhos/Fiocruz: estratégias para inserção da Fitoterapia em Saúde Pública. **Folha do farmacêutico - RIOPHARMA**, Rio de Janeiro, v. 38, p. 18-18, 2000.
- SILVA, A. F.; BARBOSA, L. C. A.; SANTOS, R. H. S.; NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R.; CASALI, V. W. D. Teor de óleo essencial de manjerição (*Ocimum basilicum*) em diferentes épocas e horários de colheita. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16., Recife, 2000. **Resumos...** Recife: [s.n.], 2000. p.76.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2003. p. 467-496.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2000.
- SPRING, O.; BIENERT, U. Capitata glandular hairs from sunflower leaves development, distributions and sesquiterpene lactone content. **Journal Plant Physiology**, Jena, v. 130, n. 4-5, p. 441-448, Oct. 1987.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Redwood: Benjamin/Cummings, 1991. 565p.
- TAVEIRA F.S.N.; ANDRADE E.H.A., LIMA W.N., MAIA J.G.S. Seasonal variation in the essential oil of *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 1, p. 27-31, Jan. 2003.
- TEUSCHER, E. **Pharmazeutische biologie**. Braunschweig: Vieweg, 1990.
- THOMAZINI, A. P. B. W.; VENDRAMIM, J. D.; LOPES, M. T. R. Extratos aquosos de *Trichilia pallida* e a traça-do-tomateiro. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 1, p. 13-17, jan./mar. 2000.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Programa Nacional dos Recursos Genetic. **Rede de informação dos recursos de Germplasm - Recursos nacionais laboratório de Germplasm**. Beltsville, Maryland. Disponível em: <<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/family.pl?2099>>. Acesso em: 26 maio 2007.

VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; ANDREI, C. C. Plantas inseticidas. In: 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: UFRGS, 2004. 1102 p.

VIEIRA, P. C.; MAFEZOLI, J.; BIAVATTI, M. W. Inseticidas de origem vegetal. In: FERREIRA, J. T. B.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C. **Produtos naturais no controle de insetos**. São Carlos: UFSCar, 2001. 176 p. (Série de Textos da Escola de Verão em Química, v.3).

VIEIRA, R.F.; SIMON, J.E. Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp.) found in the markets and used in traditional medicine in Brazil. **Economic Botany**, New York, v. 54, p. 207-216, 2000.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Oxford: Blackwell Scientific, 1994. cap. 3.

WILLIS, J.C. **Dictionary of flowering plants and ferns**. London: Columbia University, 1973.

YAMAURA, T.; TANAKA, S.; TABATA, M. Light-dependent formation of glandular trichomes and monoterpenes in thyme seedlings. **Phytochemistry**, Oxford, v. 28, n. 3, p.741-744, Mar. 1889.

ZANETTI, R.; JAFFÉ, K.; VILELA, E. F.; ZANUNCIO, J. C.; LEITE, H. G. Efeito da densidade e do tamanho de saueiros sobre a produção de madeira em eucaliptais. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 105-112, mar. 2000.

ZANETTI, R.; SANTOS, A.; DIAS, N. S.; SOUZA-SILVA, A.; CARVALHO, G. A. **Manejo integrado de pragas florestais**. Lavras: UFLA, 2004. 119p. (Textos acadêmicos).

ZANUNCIO, J. C.; SOSSAI, M. F.; OLIVEIRA, H. N.; ZANUNCIO JUNIOR, J. S. Influência das iscas formicidas Mirex-S e Blitz na paralisação de corte e no

controle de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 26, n. 2, p. 237-242, abr./jun. 2002

ARTIGO 1

TEOR E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Hyptis marruboides* EPL. (LAMIACEAE) EM DIFERENTES GENÓTIPOS

O artigo 1 foi encaminhado para submissão sendo aceito para publicação pelo Periódico Científico Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu, v.11, n.1, 2009.

BOTREL, P.P.¹; PINTO, J.E.B.P.^{1*}; FIGUEIREDO, F.C.²; BERTOLUCCI, S.K.V.¹; FERRI, P.H.³

¹Universidade Federal de Lavras (UFLA) - Departamento de Agricultura, Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais, Cx Postal 3037, CEP 37.200-000, Lavras - MG, botrelpp@bol.com.br; *jeduardo@ufla.br; suzan@ufla.br ²Universidade Federal de Lavras (UFLA) - Departamento de Ciência do Solo, doutorfcf@yahoo.com.br ³Universidade Federal de Goiás (UFG) - Instituto de Química, Cx Postal 131, Goiânia-GO, pedro@quimica.ufg.br

1 RESUMO

Hyptis marruboides Epl. (hortelã-do-campo) é uma espécie de uso medicinal conhecida pelas suas atividades contra infecções gastrointestinais, infecções de pele, dores e câimbras. Objetivou-se com este trabalho avaliar o teor e composição química do óleo essencial de *H. marruboides* em diferentes genótipos (roxo e branco) e partes da planta fresca (folhas, inflorescências e caule). Os genótipos estudados foram identificados através das inflorescências das plantas que apresentam coloração roxa e branca. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, contendo as três partes da planta de ambos os genótipos, perfazendo um fatorial 3x2, com quatro repetições. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação por duas horas e analisado por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). O maior teor de óleo essencial foi observado na inflorescência do genótipo roxo. A composição do óleo essencial de *H. marruboides* variou quantitativamente entre as partes das plantas analisadas e entre os genótipos. O composto α -tujona apresentou a maior porcentagem de área do pico nas inflorescências de genótipo roxo. As porcentagens das plantas com genótipo roxo foram em média superiores às plantas com genótipo branco.

Palavras-chave: hortelã-do-campo, planta medicinal, Cromatografia Gasosa

CONTENT AND CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OIL OF *Hyptis marrubioides* EPL. IN DIFFERENT GENOTYPES

2 ABSTRACT

Hyptis marrubioides Epl. (field mint) is a species of medicinal use known by its activities against gastrointestinal infections, skin infections, pains and cramps. It was intended by this work to evaluate the content and chemical composition of the essential oil of *H. marrubioides* in different genotypes (purple and white) and parts of the fresh plant (leaves, inflorescence and stem). The genotypes studied were identified through the inflorescences of the plants which present purple and white coloration. The experimental design was completely randomized, containing the three parts of the plant of both the genotypes, amounting to a 3 X 2 factorial with four replicates. The essential oil was extracted by hydrodistillation for two hours and analyzed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-ME). The highest essential oil content was found in the inflorescence of the purple genotype. The composition of the essential oil of *H. marrubioides* ranged quantitatively essential oil composition changed quantitatively among the analyzed parts of the plants and among the genotypes. The compound α -thujone showed the highest percentage of the peak area in the inflorescence of the purple genotype. The percentages of the plants with purple genotype were, on the average, higher than the plants with white genotype.

Key words: field mint, medicinal plants, Gas Chromatography

3 INTRODUÇÃO

O gênero *Hyptis* apresenta uma grande diversidade morfológica, principalmente na região do Cerrado brasileiro, com cerca de 300 a 400 espécies (Harley, 1988). Apresentam um aroma característico e são usadas no tratamento de infecções gastrointestinais, câimbras, dores e no tratamento de infecções da pele (Corrêa, 1931). Também possuem efeito anestésico, antiespasmódico, anti-inflamatório, além de abortivo em doses elevadas (Di Stasi et al., 1996).

Hyptis marruboides Epl. é também conhecida como hortelã-do-campo e pertence à família Lamiaceae. As Lamiaceae compreendem uma família pertencente à Ordem Tubiflorae (Lamiales), abrangendo cerca de 200 gêneros e, aproximadamente, 3.200 espécies, distribuídas em todo o mundo.

Estudos recentes têm mostrado atividades biológicas importantes relacionadas ao gênero *Hyptis*, tais como: como atividades antifúngica (Oliveira et al., 2004), antibacteriana (Souza et al., 2003), antiulcerogênica (Barbosa & Ramos, 1992), larvicida (Costa et al., 2005), e antidepressiva (Bueno et al., 2006) dentre outras.

Nas regiões tropicais e subtropicais, onde a diversidade vegetal é muito grande, o conhecimento do potencial dos recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas deve ser uma busca constante (Martins et al., 1997).

Fatores como variabilidade genética intraespecífica, condições ambientais, épocas de colheita, condições de cultivo, tipo de solo e parte da planta analisada, podem influenciar no teor e na composição química dos óleos essenciais (Hay & Svoboda, 1993). Todos esses aspectos são de fundamental importância quando se realiza o desenvolvimento de trabalhos de melhoramento de uma espécie medicinal visando a aplicação fitoterapêutica, uma vez que a qualidade dos óleos essenciais está ligada à sua constituição química.

Os principais constituintes químicos encontrados por Sales et al. (2007) em *H. marruboides*, ao estudar a variabilidade química presente no óleo essencial desta espécie em duas localidades do Sul de Minas Gerais, foram: cariofila-4(14),8(15)-dien-5 β -ol, eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol, óxido de cariofileno e (β)-cariofileno.

Na obtenção da matéria-prima, as técnicas de cultivo da espécie selecionada devem atender ao objetivo de aumentar a produção de biomassa por área, sem comprometer o valor terapêutico da planta (Castro et al., 2004). Neste aspecto, a escolha da parte da planta é de fundamental importância, visto que ela deve apresentar maior teor de óleo essencial para uma possível produção comercial e maior concentração do seu princípio ativo.

O objetivo desse trabalho foi verificar o teor e composição química do óleo essencial em inflorescências, folhas e caules em dois genótipos de *H. marruboides*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal e cultivo

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG, situada nas coordenadas geográficas 21°14' de Latitude Sul e 45°00' de Longitude Oeste de Greenwich a uma altitude de 918 m.

A exsicata da espécie *H. marruboides* está depositada no herbário da UFLA, sob o código ESAL 13955 e foi coletada em Tiradentes, MG.

As mudas de *H. marruboides* foram obtidas através de propagação *in vitro*, onde as plantas oriundas de ápices caulinares de brotações jovens de plantas do campo foram estabelecidas em meio de cultura MS (Murashige &

Skoog, 1962) e submetidas posteriormente a repicagens a cada 15 dias durante seis meses.

Após o cultivo das plantas *in vitro*, estas foram transplantadas no dia 16 de maio de 2007, para bandejas contendo substrato Plantmax®, onde permaneceram por 30 dias sob irrigação diária em casa de vegetação aclimatizada. Após a aclimatização, foram selecionadas 30 mudas, onde cada uma foi plantada individualmente em vaso plástico contendo 10 litros de composto orgânico que foram irrigados três vezes por semana.

4.2 Coleta e preparo das amostras

Após aproximadamente 110 dias do transplântio, com o florescimento das plantas, foram selecionadas aleatoriamente 11 plantas com inflorescências roxas (genótipo roxo) e 11 plantas com inflorescências brancas (genótipo branco).

Neste período, realizou-se a coleta das folhas, inflorescências e caules no período próximo às 9 horas da manhã no dia 18 setembro de 2007. Foram coletadas amostras compostas de ambos os genótipos, e destas, foram retiradas 60 g de cada parte da planta para a extração do óleo essencial do material fresco. As partes que não foram extraídas no momento da coleta foram guardadas no refrigerador até o momento da extração do óleo essencial.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, contendo as três partes da planta (inflorescências, folhas e caules) dos dois genótipos (roxo e branco), perfazendo um fatorial 3x2, com quatro repetições cada totalizando 24 parcelas.

4.3 Extração e composição química do óleo essencial

As partes da planta foram então submetidas a hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado (Wasicky, 1963) durante duas horas. O óleo

essencial foi purificado por partição líquido-líquido com diclorometano. A fase orgânica foi reunida e tratada com 5 g de sulfato de magnésio anidro durante 30 minutos. Após esse período a solução foi filtrada e o solvente evaporado em temperatura ambiente, sob capela de exaustão de gases. O teor dos óleos essenciais foi determinado pelas massas obtidas dos óleos, e expresso em porcentagem massa/massa (g de óleo por 100 g de matéria fresca).

As análises de composição química dos óleos essenciais foram realizadas em um aparelho de Cromatografia Gasosa acoplada a um Espectrômetro quadrupolar de Massas (CG-EM), Shimadzu® QP5050A (Kyoto, Japão), nas seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida, modelo CBP-5 (30 m de comprimento × 0,25 mm de diâmetro interno × 0,25 µm de espessura do filme em 5% de fenilmetilpolisiloxano) (Shimadzu®, Japão), com fluxo de 1 mL.min⁻¹ de hélio como gás de arraste; aquecimento com temperatura programada (60°C com um gradiente de 3°C.min⁻¹ até 240°C e, em seguida, com um gradiente de 10°C.min⁻¹ até 270°C, mantendo-se uma isoterma de 7 min, com um tempo total de corrida de 70 min). A energia de ionização do detector foi de 70 e V, sendo o volume de injeção da amostra de 0,5 µL diluídas em diclorometano (grau ultra-resíduo, Baker, EUA) e uma razão de injeção de 1:20. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 220°C e 240°C, respectivamente. A análise foi conduzida no modo varredura, a uma velocidade de 1,0 varredura.s⁻¹, com um intervalo de massas de 40-400 *m/z*. A análise quantitativa foi obtida pela integração do cromatograma total de íons (TIC). A identificação dos constituintes foi realizada por comparação, automática e manual, dos espectros de massas com os das bibliotecas National Institute of Standards and Technology/EPA/NHI (1998), por comparação dos espectros de massas e índices de retenção (IR) com os da literatura (Adams, 2001) e co-injeção com padrões autênticos. Os Índices de Retenção foram

calculados através da co-injeção com uma mistura de hidrocarbonetos, C8–C32 (Sigma, EUA), e com aplicação da equação de Dool & Kratz (1963).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teor do óleo essencial

Foram observadas características organolépticas distintas para os óleos obtidos dos diferentes genótipos. Para plantas com inflorescência roxa, o óleo essencial apresentou coloração amarelada, já para plantas com inflorescência branca, este apresentou coloração mais clara, quase incolor. Os óleos essenciais apresentaram pouca viscosidade e odor forte característico da planta fresca, sendo este mais acentuado nas plantas de genótipo roxo.

Na Figura 1, podem-se verificar os resultados do teor de óleo essencial para as variáveis analisadas. Observa-se que foram significativas as diferenças entre os teores de óleo obtidos nas diferentes partes da planta e nos genótipos. Independente da parte da planta o genótipo roxo apresentou maior teor de óleo essencial, sendo as inflorescências a parte mais produtiva.

O teor de óleo essencial das inflorescências nas plantas de genótipo roxo (0,1597%) foi diferente do teor obtido nas folhas (0,0668%). No entanto, a quantidade de inflorescências disponíveis na planta é bem menor comparado à quantidade de folhas, além do fato de que esta espécie floresce apenas uma vez por ano, o que inviabilizaria uma extração de óleo comercial das inflorescências, mesmo apresentando o maior teor de óleo.

Observou-se também que para os dois genótipos estudados, as inflorescências de *H. marruboides* produziram numericamente maior teor de óleo do que nas folhas e nos caules. Resultado semelhante foi também observado em plantas de *Hyptis spicigera* Lam., em que as folhas frescas

produziram 0,13%, enquanto, as inflorescências frescas, produziram quase três vezes mais óleo (0,37%) (Kini et al., 1993).

Silva et al. (2003) estudando o teor de óleo essencial nas folhas, caules e inflorescências frescas de *Hyptis suaveolens* observaram que as inflorescências também continham maior teor de óleo essencial (0,068%) em relação aos caules (0,007%) e folhas (0,030%).

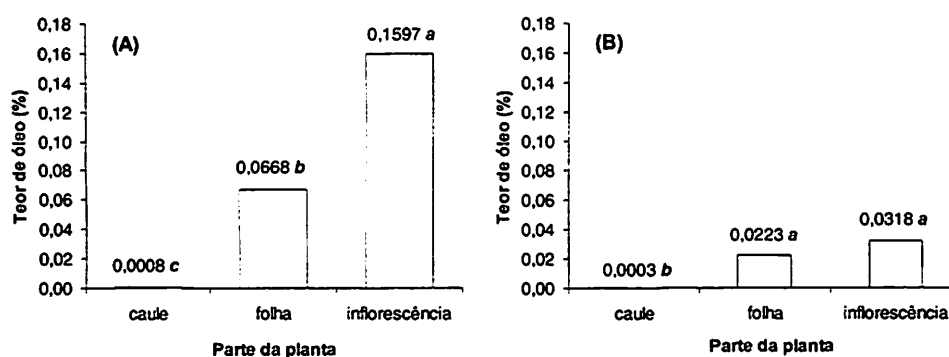


FIGURA 1 Valores médios do teor de óleo essencial, em porcentagem, extraído da massa fresca de três partes da planta (caule, folha e inflorescência) do genótipo roxo de *Hyptis marrubioides* (A) e do genótipo branco de *Hyptis marrubioides* (B).

Nos dois genótipos estudados o caule foi a parte da planta que apresentou o menor teor de óleo essencial. Esse fato pode ser explicado pela presença de estruturas bastante lignificadas presentes no caule, o que diminuiria a necessidade de haver estruturas protetoras de óleo essencial. Além disso, o caule não é um tecido preferencial para ataque de herbívoros.

5.2 Composição química do óleo essencial

A composição química do óleo essencial extraído do caule não pôde ser analisada pelo fato da concentração do mesmo ter sido insuficiente para realização das análises cromatográficas.

Os componentes majoritários do óleo essencial nos dois genótipos diferenciaram na porcentagem em relação à classe de monoterpenos e sesquiterpenos. Observa-se na Tabela 1, que no genótipo branco, tanto em folhas como em inflorescências, predominaram sesquiterpenos. No genótipo roxo, a folha mostrou um equilíbrio entre mono e sesquiterpenos. No entanto, nas inflorescências, a classe de monoterpenos apresentou uma porcentagem relativa de 70,7%.

Estudando a composição química do óleo essencial das folhas e flores de dois acessos de *Ocimum selloi* Benth., Martins et al. (1997) encontraram como componente principal para o acesso A o estragol, o qual representou 94,95% e 92,54% do óleo das folhas e flores, respectivamente. Já o óleo obtido das folhas e flores do acesso B foi constituído de 65,49% e 66,18% de metil-eugenol, respectivamente. No óleo essencial de *H. marrubioides*, observou-se mudanças qualitativas apenas para o composto γ -himachaleno, o qual não foi identificado nas inflorescências e folhas do genótipo branco. Para os demais compostos, foram observadas grandes diferenças quantitativas entre as partes da planta analisadas e os genótipos, com base nas porcentagens das áreas dos picos.

Os componentes α -tujona e β -tujona apresentaram a maior porcentagem nas inflorescências de genótipo roxo, 41% e 15,9%, respectivamente. A porcentagem de área dos picos desses compostos foi sempre maior no genótipo roxo tanto para folhas quanto para as inflorescências. As porcentagens nas inflorescências de genótipo roxo chegaram a ser até nove vezes maiores, comparadas às inflorescências de genótipo branco.

TABELA 1 Porcentagem de área dos picos cromatográficos correspondentes aos compostos identificados no óleo essencial das inflorescências e folhas de *Hyptis marrubiioides* nos genótipos branco e roxo.

IK	Constituintes	Classe	Genótipo branco		Genótipo roxo	
			Inflorescência	Folha	Inflorescência	Folha
		 % área			
1098	linalol	MO	0,9	1,0	1,1	1,0
1104	β -tujona	MO	1,7	1,7	15,9	8,8
1114	α -tujona	MO	7,1	6,4	41,0	25,1
1132	iso-3-tujanol	MO	0,8	2,4	0,7	2,0
1138	α -pinocarveol	MO	1,3	2,8	0,9	1,4
1143	β -verbenol	MO	2,5	2,5	1,7	2,1
1171	β -3-pinocanfona	MO	2,4	1,8	5,8	4,2
1175	terpinen-4-ol	MO	2,1	2,0	1,9	1,0
1138	α -terpineol	MO	2,6	2,1	1,6	1,9
1296	mitenato de metila	MO	0,9	1,0	0,1	0,1
1375	α -copaeno	S	4,6	5,0	4,7	7,6
1419	β -cariofileno	S	12,8	12,6	6,5	11,8
1453	α -humuleno	S	0,8	1,2	0,4	0,9
1480	γ -muuroleno	S	18,1	18,9	8,4	16,7
1483	γ -himachaleno	S	0,0	0,0	3,7	6,5
1514	γ -cadineno	S	1,4	1,4	0,5	0,8
1550	epóxido de italiceno	SO	2,8	1,6	0,1	0,1
1557	epóxido de italiceno (isômero desconhecido)	SO	1,3	0,9	0,1	0,1
1573	dendrolasina	SO	1,5	0,8	0,1	0,1
1581	óxido de cariofileno	SO	8,1	3,9	0,9	1,2
1631	cariofila-4(14),8(15)-dien-5- α -ol	SO	2,3	1,1	0,1	0,1
1635	cariofila-4(14),8(15)-dien-5- β -ol	SO	7,8	5,6	0,7	1,1
1649	β -eudesmol	SO	3,3	3,7	0,1	0,1
1652	α -eudesmol	SO	1,1	2,2	0,1	0,1
1669	14-hidróxi-(Z)-cariofileno	SO	1,5	1,0	0,1	0,1
1684	germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	SO	8,0	10,4	2,2	4,2
Total dos picos dos monoterpenos (MO)			22,3	23,7	70,7	47,6
Total dos picos dos sesquiterpenos (S)			37,7	39,1	24,2	44,3
Total dos picos dos sesquiterpenos oxigenados (SO)			37,7	31,2	4,5	7,2
Sesquiterpenos Totais			75,4	70,3	28,7	51,5
TOTAL DOS PICOS			97,7	94,0	99,4	99,1

IK: índice Kovats.

Para os compostos γ -muuroleno, β -cariofileno, óxido de cariofileno, cariofila-4(14),8(15)-dien-5- β -ol e germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol houve uma inversão, apresentando maiores porcentagens nas plantas de genótipo branco.

Silva et al. (2003) obtiveram um número diferente de picos para as folhas (45 picos), inflorescências (27 picos) e caules (44 picos) analisados no cromatograma do óleo essencial de *H. suaveolens*. Queiroz et al. (1990) sugeriram que nesta espécie pode haver alocação de recursos para a floração e um decréscimo na produção de terpenos. Este fato não foi observado para *H.*

marruboides que apresentou o mesmo número de picos para as partes da planta analisadas (26 picos).

Sales et al. (2007) estudando o óleo essencial de *H. marruboides* de caules e folhas (frescos, secos e inteiros ou em pedaços) coletados em duas localidades do Sul de Minas Gerais, identificaram 26 compostos que representaram 96-99% dos constituintes voláteis. Sesquiterpenos oxigenados foram os principais grupos de constituintes na maioria das populações (52,9-93,2%). No entanto, importantes diferenças foram observadas nos teores da maioria dos constituintes para caules e folhas, e os materiais de plantas inteiras ou em pedaços resultaram em composições químicas similares.

Por ser um trabalho fitotécnico, sugere-se a realização de novos experimentos que revelem quais fatores estão influenciando estas diferenças, principalmente estudos genéticos e morfológicos.

6 CONCLUSÕES

A parte da planta de *H. marruboides* que apresentou o maior teor de óleo essencial foi à inflorescência do genótipo roxo. Com relação à composição química do óleo essencial, as porcentagens das plantas com genótipo roxo foram em média superiores às plantas com genótipo branco.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BIBLIOTECA CENTRAL - UFLA

BARBOSA, P.P.P.; RAMOS, C.P. Studies on the antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis mutabilis* Briq in rats. **Phytother Research**, Sussex, v. 6, p. 114-115, Mar./Apr. 1992.

BUENO, A. X.; MOREIRA, A. T. S.; SILVA, F. T.; ESTEVAM, C. S.; MARCHIORO, M. Effects of the aqueous extract from *Hyptis pectinata* leaves on rodent central nervous system. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, n. 3, p. 317-323, Jul./Set. 2006.

CASTRO, H.G.; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H.; MOSQUIM, P.R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 113p.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1931.

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L.; SANTOS, N. K. A.; CARDOSO, A. L. H.; LEMOS, T. L. G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 15, n. 4, p. 304-309, Dez. 2005.

DI STASI, L.C.; LIMA, C. A. H.; MARIOT, A.; PORTILHO, W. G.; REIS, M. S. **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996.

DOOL, H. van den; KRATZ, P.D.J.A. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 11, n. 4, p. 463-471, 1963.

HARLEY, R.M. Evolution and distribution of *Eriope* (Labiatae) and its relatives in Brasil. In: WORKSHOP ON NEOTROPICAL DISTRIBUTION PATTERNS, 1988, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1988. p. 71-80.

HAY, R.K.M.; SVOBODA, K.P. **Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production**. Essex: Longman Group, 1993. 5p.

KINI, F.; KAM, B.; AYCARD, J. P.; GAYDON, E. M.; BOMBARDA, I. Chemical composition of the essential oil of *Hyptis spicigera* Lam. from

- Burkina Faso. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 5, n. 2, p. 219-21, 1993.
- MARTINS, E. R.; CASALI, V. W. D.; BARBOSA, L. C. A.; CARAZZA, F. Essential oil in the taxonomy of *Ocimum selloi* Benth. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 29-32, 1997.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NATIONAL OF INSTITUTE STANDARDS AND TECHNOLOGY. **PC version of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database**. Gaithersburg: U.S. Department of Commerce, 1998.
- OLIVEIRA, C. M. A. de; SILVA, M. D. R.; KATO, L.; SILVA, C. C. da; FERREIRA, H. D.; SOUZA, L. K. H. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 15, p. 756-759, 2004.
- SALES, J. F.; PINTO, J. E. B. P.; BOTREL, P. P.; OLIVEIRA, C. B. A.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; SERAPHIN, J. C. Composition and chemical variability in the essential oil of *Hyptis marrubioides* Epl. **Journal Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 19, p. 552, 2007.
- SILVA, A.F.; BARBOSA, L.C.A.; SILVA, E.A.M. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2003.
- SOUZA, L.K.H. et al. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 7, p. 963-965, Oct. 2003.
- WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais. **Revista Faculdade de Farmácia e Bioquímica**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 77-81, jan./jun. 1963.

ARTIGO 2

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E TEOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Hyptis marruboides* EPL. CULTIVADA EM DOIS AMBIENTES

O artigo 2 será transcrito no formato do Periódico Científico Química Nova e encaminhado para submissão

Priscila Pereira Botrel*, José Eduardo Brasil P. Pinto, Ana Clara Caxito de Araújo e Suzan Kelly Vilela Bertolucci

Departamento de Agricultura, Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais, Universidade Federal de Lavras, Cx Postal 3037, CEP 37.200-000, Lavras - MG, Brasil

Felipe Campos Figueiredo

Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras, Cx Postal 3037, CEP 37.200-000, Lavras - MG, Brasil

Pedro Henrique Ferri e Deomar P. Costa

Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Cx Postal 131, Goiânia - GO, Brasil

1 RESUMO

Os óleos essenciais no gênero *Hyptis* são tradicionalmente usados como anestésico, antiespasmódico, anti-inflamatório, além de abortivo em doses elevadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química e o teor de óleo essencial de *Hyptis marrubioides* em diferentes ambientes de cultivo (campo e casa de vegetação). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 10 repetições para cada ambiente de cultivo. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação por duas horas e analisado por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM). As maiores porcentagens de concentração relativa da área do pico (%) foram obtidas no cultivo em campo com os compostos germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol, e trans-tujona. O maior teor de óleo essencial foi encontrado em plantas cultivadas no campo.

Palavras-Chave: planta medicinal, Cromatografia, cultivo

CHEMICAL COMPOSITION AND CONTENT OF ESSENTIAL OIL OF *Hyptis marruboides* EPL. CULTIVATED IN TWO ENVIRONMENTS

2 ABSTRACT

The essential oil in the genus *Hyptis* are traditionally used as anesthetics, antispasmodics, anti-inflammatory, in addition to abortive at high doses. The purpose of this work was to evaluate the content and chemical composition of the essential oil of *Hyptis marruboides* in different cultivation environments (field and greenhouse). The experimental design was completely randomized, with ten replicates for each cultivation environments. The essential oil was extracted by hydrodistillation for two hours and analyzed by Gas Chromatography coupled to Mass Espectrometry (GC-ME). The highest percentages of the relative concentration of the peak area (%) were obtained in field cultivation with the compounds germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol and trans-thujone. The highest essential oil content was found in field-cultivated plants.

Key-Words: medicinal plant, Chromatography, cultivation

3 INTRODUÇÃO

O gênero *Hyptis* apresenta uma grande diversidade morfológica, principalmente na região do cerrado brasileiro, com cerca de 300 a 400 espécies (Harley, 1988). Apresentam um aroma característico e são usadas no tratamento de infecções gastrointestinais, câimbras, dores e no tratamento de infecções de pele (Corrêa, 1931).

Hyptis marrubioides é conhecida popularmente como hortelã do campo e pertence à família Lamiaceae. As Lamiaceae compreendem uma família pertencente à Ordem Tubiflorae (Lamiales), abrangendo cerca de 200 gêneros e, aproximadamente, 3.200 espécies, distribuídas em todo o mundo.

Estudos recentes têm mostrado atividades biológicas importantes neste gênero, tais como atividades antifúngica (Oliveira et al., 2004), antibacteriana (Souza et al., 2003), antiulcerogênica (Barbosa & Ramos, 1992), larvicida (Costa et al., 2005), antidepressiva (Bueno et al., 2006), inseticida (Kuhnt et al., 1995), dentre outras.

Os principais constituintes químicos encontrados em *H. marrubioides*, ao estudar a variabilidade química presente no óleo essencial desta espécie em duas localidades do Sul de Minas Gerais, foram: cariofila-4(14),8(15)-dien-5 β -ol, eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol, óxido de cariofileno e (β)-cariofileno (Sales et al., 2007).

A composição dos metabólitos secundários nas plantas é resultado do balanço entre a sua formação e transformação que ocorrem durante o crescimento em decorrência principalmente de três fatores: genéticos, ambientais e das técnicas de cultivo (Castro et al., 2002). Os fatores ambientais têm grande influência sobre o desenvolvimento das plantas medicinais, aromáticas e condimentares e na sua produção de princípios ativos. A composição desses produtos pode ser grandemente alterada por esses fatores,

pois a ação deles é simultânea e inter-relacionada (Corrêa Júnior et al., 2006). O ambiente no qual o vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo influencia sobremaneira a composição química dos óleos voláteis (Simões & Spitzer, 2000).

Para a espécie *H. marruboides* não existem trabalhos relacionando a composição química com ambiente de cultivo. Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar a composição química e o teor do óleo essencial de *H. marruboides* em plantas cultivadas em condição de campo e casa de vegetação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Condições de Cultivo

O cultivo das plantas em campo foi realizado na Fazenda Experimental Gota da Esperança localizada na Universidade Federal de Lavras, UFLA. O município de Lavras localiza-se na região Sul de Minas Gerais. Situa-se a 21°14' de Latitude Sul e 45°00' de Longitude Oeste de Greenwich a uma altitude de 918 m. Segundo a classificação de Koppen, o clima enquadra-se no tipo Cwa, temperado úmido, com verão quente e inverno seco. Na Tabela 1 encontram-se os dados climatológicos referentes ao dia de coleta das folhas.

Plântulas de *H. marruboides* cultivadas *in vitro* foram transplantadas para bandejas contendo substrato Plantmax[®], onde permaneceram por 45 dias sob irrigação em casa de vegetação climatizada. O transplantio das mudas, para o campo foi realizado em 15 de fevereiro de 2007. O plantio foi realizado em covas, espaçamento 1,5x1,0 m totalizando 40 mudas. Foram realizadas duas adubações, uma com 30 e outra aos 60 dias após o plantio, usando 10 g por cova de NPK (20-0-20). A colheita de folhas frescas foi realizada 455 dias após o transplantio das mudas, próximo às oito horas da manhã. Coletaram-se apenas

folhas do terço superior da planta. Para cada repetição, que foi representada por três plantas colhidas aleatoriamente, utilizou-se uma amostra composta de 40g de massa fresca para a hidrodestilação.

O cultivo das plantas em casa de vegetação aclimatizada foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras, UFLA. A propagação de *H. marruboides* foi feita também em cultivo *in vitro*, em bandejas contendo substrato Plantmax®, onde permaneceram por 30 dias sob irrigação em casa de vegetação climatizada. Após este período, realizou-se o transplântio das mudas em 22 de agosto de 2007, para 100 vasos plásticos contendo 10 litros de composto orgânico. A colheita de folhas frescas foi realizada 275 dias após o transplântio das mudas, próximo às sete horas da manhã. A metodologia de coleta foi a mesma utilizada do ambiente em campo.

TABELA 1 Dados climatológicos em Lavras - Sul de Minas Gerais, no dia de coleta das folhas para o ambiente campo e casa de vegetação.

Dia da coleta	Temperatura (°C)			Precipitação total (mm)	UR (%)	Insolação (horas)
	máx	mín	méd			
15/5/2008						
CAMPO	26,4	12,2	17,8	0	76,5	9,1
CASA DE VEGETAÇÃO	32	18	24	0	53,5	9,1

4.2 Extração do óleo essencial

A extração do óleo essencial em ambos ambientes de cultivo foi realizada pelo método de hidrodestilação em aparelho de Clevenger, por 120 minutos.

Para a purificação do óleo essencial, o hidrolato foi submetido à partição líquido-líquido em funil de separação, realizando-se três lavagens do hidrolato com três porções de 5 mL de diclorometano por meia hora cada. As frações orgânicas foram reunidas e secas com sulfato de magnésio anidro, deixando-o

agir por meia hora e, posteriormente, o sal foi removido por filtração simples e o solvente foi evaporado à temperatura ambiente sob capela de exaustão de gases. Diante da massa obtida, determinou-se o teor percentual do óleo essencial pela fórmula: $T\% = \text{massa do óleo (g)} / 40 \text{ g} \times 100$.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 10 repetições para cada ambiente de cultivo. As variáveis analisadas foram submetidas à análise de variância, em nível de 5% de probabilidade pelo teste de F, com auxílio do software Sisvar (Ferreira, 2000).

4.3 Composição química do óleo essencial

A composição química do óleo essencial foi feita por uma amostra composta formada pelo agrupamento das repetições de cada tratamento.

As análises foram realizadas em um aparelho de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro quadrupolar de massas (CG-EM), Shimadzu® QP5050A (Kyoto, Japão), nas seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida, modelo CBP-5 (30 m de comprimento \times 0,25 mm de diâmetro interno \times 0,25 μm de espessura do filme em 5% de fenilmetilpolisiloxano) (Shimadzu®, Japão), com fluxo de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de hélio como gás de arraste; aquecimento com temperatura programada (60°C com um gradiente de 3°C. min^{-1} até 240°C e, em seguida, com um gradiente de 10°C. min^{-1} até 270°C, mantendo-se uma isoterma de 7 min, com um tempo total de corrida de 70 min). A energia de ionização do detector foi de 70 e V, sendo o volume de injeção da amostra de 0,5 μL diluídas em diclorometano (grau ultra-resíduo, Baker, EUA) e uma razão de injeção de 1:20. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 220°C e 240°C, respectivamente. A análise foi conduzida no modo varredura, a uma velocidade de 1,0 varredura. s^{-1} , com um intervalo de massas de 40-400 m/z. A análise quantitativa foi obtida pela integração do cromatograma total de íons (TIC). A identificação dos constituintes foi realizada por

comparação, automática e manual, dos espectros de massas com o banco de dados das bibliotecas National Institute of Standards And Technology/EPA/NHI (1998), por comparação dos espectros de massas e índices de retenção (IR) com os da literatura (Adams, 2001) e co-injeção com padrões autênticos. Os Índices de Retenção foram calculados através da co-injeção com uma mistura de hidrocarbonetos, C8–C32 (Sigma, EUA), e com aplicação da equação de Dool & Kratz (1963).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo essencial de *H. marruboides* obtido por hidrodestilação apresentou coloração levemente amarelada e intenso odor em plantas cultivadas no campo. Já no cultivo em casa de vegetação observou-se coloração clara, quase incolor e odor menos intenso.

De acordo com o teste de F houve diferença significativa no teor de óleo essencial de *H. marruboides* para os ambientes de cultivo.

Observa-se que plantas cultivadas em campo apresentaram maior teor de óleo essencial, sendo em média três vezes maior que no cultivo em casa de vegetação (Figura 1).

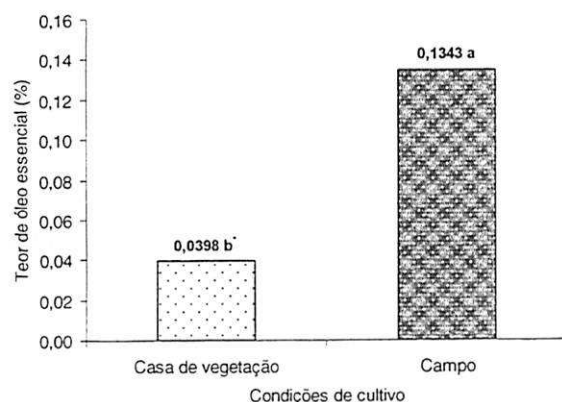


FIGURA 1 Valores médios do teor de óleo essencial, em porcentagem, extraído da massa fresca de folhas inteiras de *H. marruboides* nas diferentes condições de cultivo. *As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de F.

O maior teor de óleo essencial encontrado em folhas de plantas de *H. marruboides* cultivadas no campo pode ser atribuído às condições ambientais que estas plantas foram submetidas. Em *Mentha spicata* L. cultivada a campo obteve-se conteúdo médio de 1,66% de óleo, com variações entre 0,90 e 2,70%, sendo que o conteúdo do óleo foi influenciado por condições ambientais de temperatura e intensidade luminosa (Telci et al., 2004).

Em ambientes adversos, as plantas “escolhem” onde aplicar mais sua energia e seus recursos. Na reprodução, no crescimento ou na produção de compostos químicos para se defender dos insetos, herbívoros, microrganismos patogênicos e outros inimigos naturais (Carneiro & Fernandes, 1996). As plantas desviam substâncias do metabolismo primário, que poderiam gerar açúcares, proteínas e gorduras, que fornecem energia para o crescimento, a fim de produzir metabólitos secundários, como os terpenóides, em resposta a fatores externos. Esse fato pode explicar a maior quantidade de óleo essencial encontrada em plantas de *H. marruboides* cultivadas no campo, tal como a maior quantidade de compostos identificados no ambiente em campo (32)

comparado a plantas cultivadas em casa de vegetação (17) onde o ambiente de cultivo é mais controlado (Tabela 2).

No cultivo de manjeriço em hidroponia e em diferentes substratos sob ambiente protegido, o tipo de cultivo não influenciou significativamente o rendimento de óleos essenciais nas duas espécies estudadas de folha estreita (*Ocimum minimum* L.) e de folha larga (*Ocimum basilicum* L.). Com relação a composição química, não houve alteração significativa entre os óleos essenciais obtidos de plantas, de mesma espécie, em função dos sistemas de cultivo utilizados, evidenciando a regulação genética da biossíntese dessas substâncias (Fernandes et al., 2004). O mesmo não foi observado para *H. marruboides* onde o teor e a composição química do óleo essencial variaram muito com as formas de cultivo.

A falta de uniformidade encontrada quando se compara os compostos químicos produzidos em plantas de mesmo genótipo submetidas a diferentes condições, reflete o dinamismo das interconversões que ocorrem continuamente entre os constituintes dos óleos essenciais. Estas interconversões envolvem reações de oxidação, redução, desidratação, ciclização e isomerização, influenciadas por fatores ambientais (Castro, 2001; Santos & Innecco, 2004).

Os dados obtidos das determinações qualitativas e quantitativas dos componentes principais presentes no óleo essencial de *H. marruboides* estão apresentados na Tabela 2. Esses componentes representaram 99,19% da composição química do óleo no cultivo em campo e 60,35% em casa de vegetação.

Houve uma diferença marcante entre os teores totais de monoterpenos e sesquiterpenos dos óleos essenciais obtidos de folhas de *H. marruboides* cultivadas nos dois ambientes. O teor de sesquiterpenos oxigenados foi maior nas plantas cultivadas no campo, enquanto os hidrocarbonetos sesquiterpênicos foram um pouco mais abundantes nas plantas cultivadas em casa de vegetação.

No entanto, a mudança mais considerável na composição química do óleo essencial foi observada no teor de monoterpenos oxigenados, onde a soma dessa classe de constituintes no óleo essencial extraído das folhas de plantas cultivadas no campo foi de 22,85%, enquanto que daquele obtido das plantas cultivadas em casa de vegetação foi de apenas 1,12% (Tabela 2).

TABELA 2 Porcentagem de área dos picos cromatográficos correspondentes aos compostos identificados no óleo essencial em folhas de *H. marruboides* nos dois ambientes de cultivo.

Picos	IK	Constituintes	Classe	Condição de cultivo	
				Campo	Casa de vegetação
			% área.....	
1	1098	linalool	MO	0,58	-
2	1104	cis-tujona	MO	3,36	-
3	1114	trans-tujona	MO	9,98	0,41
4	1132	iso-3-tujanol	MO	2,46	t
5	1143	cis-verbenol	MO	1,31	-
6	1171	cis-3-pinocanfona	MO	2,64	t
7	1175	terpinen-4-ol	MO	1,12	-
8	1138	α -terpineol	MO	1,40	0,71
9	1375	α -copaeno	HS	5,27	5,83
10	1387	β -bourboneno	HS	1,63	-
11	1419	β -cariofileno	HS	10,42	8,93
12	1453	α -humuleno	HS	0,86	1,01
13	1480	γ -muuroleno	HS	12,83	11,58
14	1483	γ -himachaleno	HS	3,54	-
15	1491	trans-muurola-4(14),5-dieno	HS	0,10	1,30
16	1514	γ -cadineno	HS	1,58	3,15
17	1522	Δ -cadineno	HS	0,66	2,24
18	1550	occidentalol	SO	0,64	1,16
19	1550	epóxido de italiceno	SO	1,07	-
20	1557	epóxido de italiceno (isômero desconhecido)	SO	0,55	-
21	1581	óxido de cariofileno	SO	7,36	8,03
22	1590	β -copaen-4- α -ol	SO	0,97	-
23	1591	salvial-4(14)-en-1-ona	SO	0,10	-
24	1630	muurola-4,10(14)-dien-1- β -ol	SO	1,31	2,00
25	1631	cariofila-4(14),8(15)-dien-5- α -ol	SO	1,69	2,10
26	1635	cariofila-4(14),8(15)-dien-5- β -ol	SO	4,14	7,17
27	1645	α -muurolol	SO	0,97	3,21
28	1649	β -eudesmol	SO	0,67	-
29	1659	desconhecido	SO	2,15	-
30	1660	cis-calamenen-10-ol	SO	0,60	0,79
31	1669	14-hidróxi-(Z)-cariofileno	SO	0,89	-
32	1684	germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	SO	16,34	0,73
Monoterpenos oxigenados (%)			MO	22,85	1,12
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos (%)			HS	36,89	34,04
Sesquiterpenos oxigenados (%)			SO	39,45	25,19
Total dos picos identificados (%)				99,19	60,35

t: quantidade traço.

De acordo com Sales et al. (2007), o principal grupo de constituintes de caules e folhas na maioria das populações de *H. marrubioides* coletados em duas localidades do Sul de Minas Gerais, foram sesquiterpenos oxigenados (52,9-93,2%), corroborando com os resultados do presente trabalho onde os sesquiterpenos oxigenados prevaleceram na composição química do óleo essencial no ambiente em campo (39,45%).

Os monoterpenos são os principais componentes do óleo da família Lamiaceae, cuja *Mentha x piperita* L. é considerada planta modelo para estudo do seu metabolismo (Phatak & Heble, 2002; Scavroni et al., 2005). Resultados contrários foram obtidos para *H. marrubioides*, onde a maior concentração relativa dos compostos foi encontrada na classe dos sesquiterpenos. A biossíntese e o acúmulo do óleo resulta de uma complexa integração de diferentes rotas metabólicas, que requer contínua produção de precursores, seu transporte e translocação para o sítio ativo de síntese que corresponde às glândulas de óleo (Srivastava et al., 2003).

Os compostos trans-tujona e germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol apresentaram a maior porcentagem de área relativa no cultivo em campo, 9,98% e 16,34%, respectivamente (Tabela 2). As porcentagens de área do pico das plantas de *H. marrubioides* cultivadas no campo chegaram a ser até vinte vezes maior, comparadas às plantas cultivadas em casa de vegetação.

Para o composto cariofila-4(14),8(15)-dien-5- β -ol houve uma maior porcentagem nas plantas cultivadas em casa de vegetação. Já os compostos α -copaeno, β -cariofileno, γ -muuroleno e óxido de cariofileno apresentaram-se quantitativamente equilibrados nos dois ambientes de cultivo (Figura 2). As estruturas dos constituintes majoritários encontrados no óleo essencial de *H. marrubioides* estão expostas na Figura 3.

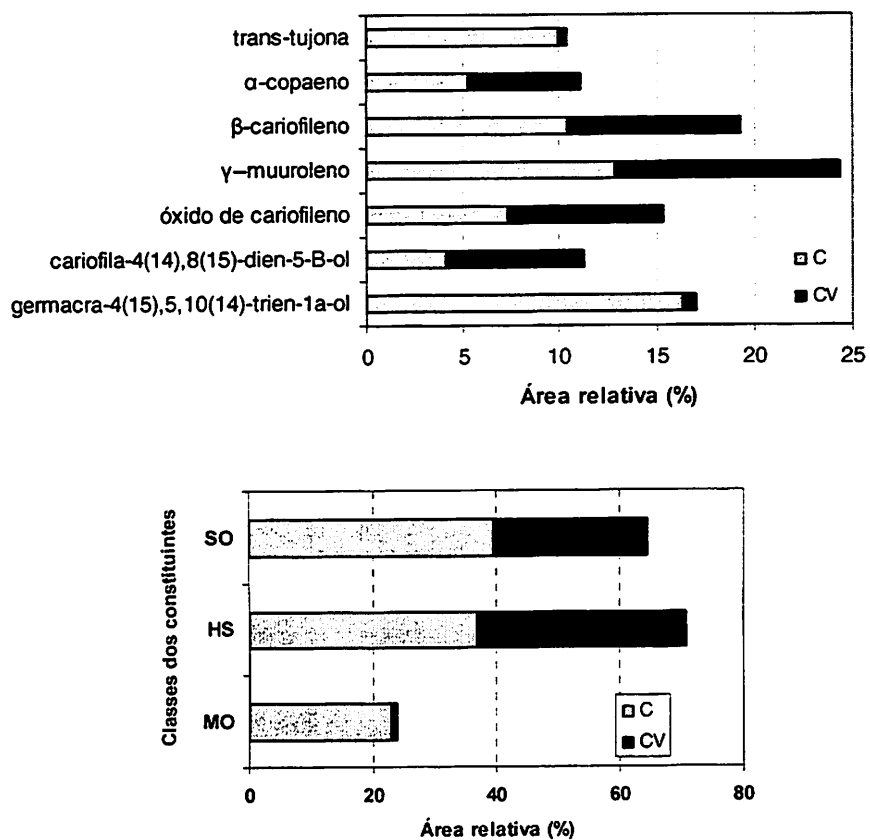


FIGURA 2 Porcentagem de área relativa correspondente aos compostos majoritários (a) e as classes dos constituintes (b) identificados no óleo essencial em folhas de *H. marruboides* no cultivo em campo (C) e em casa de vegetação (CV).

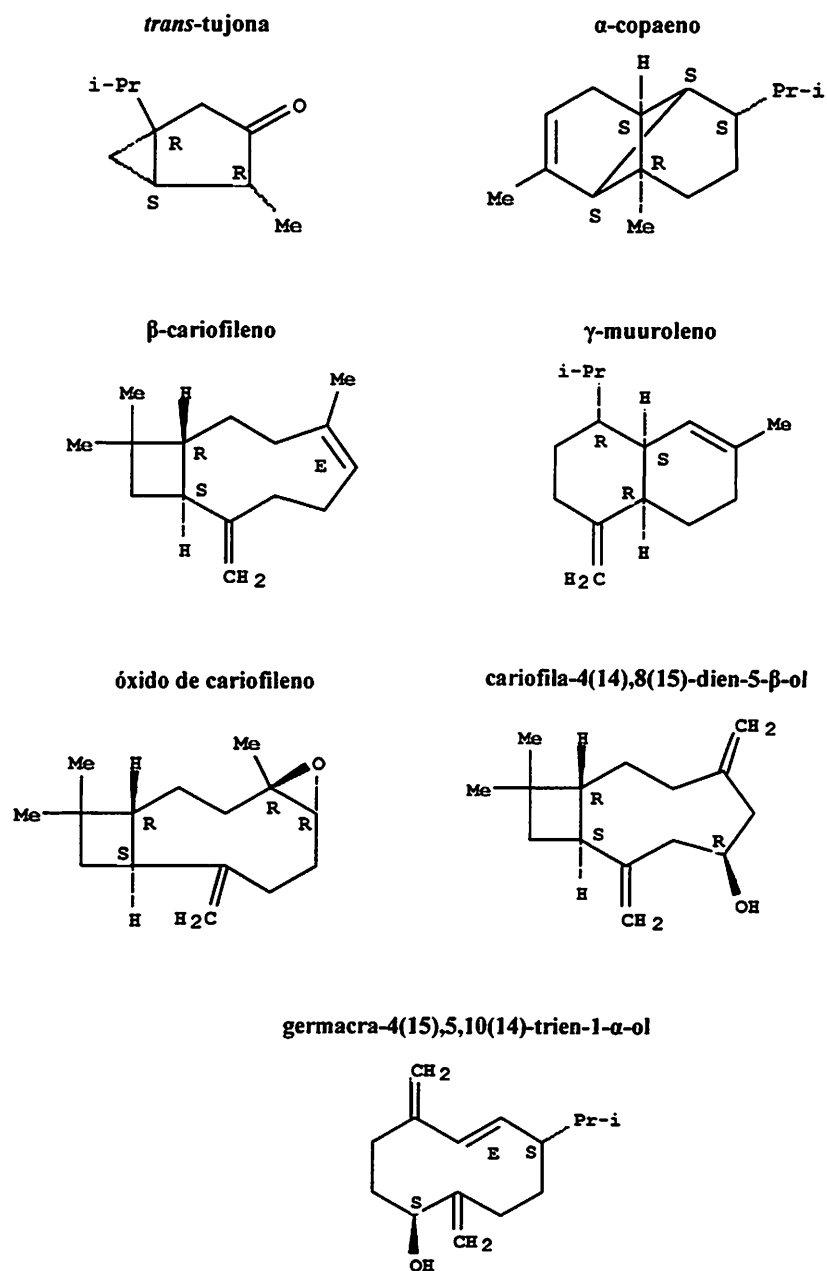


FIGURA 3 Estruturas químicas dos compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *H. marrubioides* nos ambientes de cultivo em campo e casa de vegetação.

A idade das plantas de *H. marruboides* pode ter influenciado na variação da composição química encontrada nos dois ambientes de cultivo. Apesar da colheita das folhas terem sido realizadas na mesma época, as plantas cultivadas em casa de vegetação eram seis meses mais jovens que plantas cultivadas no campo. Estudos evidenciam claramente que o perfil de terpenóides varia significativamente com relação ao estágio de diferenciação da planta. O conteúdo total de monoterpenos em *M. x piperita* aumenta com a idade e a sua composição é significativamente alterada durante o desenvolvimento das folhas (Gershenzon et al., 2000).

Sugere-se com este trabalho a realização de novos experimentos que revelem quais fatores estão influenciando estas diferenças no teor e composição química do óleo de *H. marruboides*, principalmente estudos ecofisiológicos e relacionados ao estágio de desenvolvimento da planta.

6 CONCLUSÕES

Plantas de *H. marruboides* cultivadas no campo apresentaram maior teor de óleo essencial, comparadas ao cultivo em casa de vegetação.

Diferenças qualitativas e quantitativas (concentrações relativas) foram observadas nos compostos em ambos ambientes de cultivo.

As maiores porcentagens de concentração relativa da área do pico foram obtidas no cultivo em campo com os compostos germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol, e trans-tujona.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured, 2001. 456 p.
- BARBOSA, P. P. P.; RAMOS, C. P.; Studies on the antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis mutabilis* Briq. in rats. **Phytotherapy Research**, Hoboken, v. 6, n. 2, p. 114-115, 1992.
- BUENO, A. X.; MOREIRA, A. T. S.; SILVA, F. T.; ESTEVAM, C. S.; MARCHIORO, M. Effects of the aqueous extract from *Hyptis pectinata* leaves on rodent central nervous system. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, n. 3, p. 317-323, Jul/Set. 2006.
- CARNEIRO, M. A. A.; FERNANDES, G. W. Sexo, drogas e herbivoria. As relações conflituosas entre plantas e insetos. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 118, p. 32-35, mar. 1996.
- CASTRO, D. M.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M. Composição fitoquímica dos óleos essenciais de folhas da *Lippia alba* (Mill). N.E.Br em diferentes épocas de colheita e partes do ramo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 4, n. 2, p. 75-9, 2002.
- CASTRO, D.M. **Efeito da variação sazonal, colheita selecionada e temperaturas de secagem sobre a produção de biomassa, rendimento e composição de óleos essenciais de folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britt. e Wilson (Verbenaceae)**. 2001. 132 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Estadual do Estado de São Paulo, Botucatu.
- CORREA JUNIOR, C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. **Cultivo agroecológico de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Curitiba: Ministério do Desenvolvimento Agrário, 2006. 75 p.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1931.
- COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L.; SANTOS, N. K. A.; CARDOSO, A. L. H.; LEMOS, T. L. G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia*

sidoides e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 15, n. 4, p. 304-309, Dez. 2005.

DOOL, H. van den; KRATZ, P. D. J. A. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 11, n. 4, p. 463-471, 1963.

FERNANDES, P. C.; FACANALI, R.; TEIXEIRA, J. P. F.; FURLANI, P. R.; MARQUES, M. O. M. Cultivo de manjeirão em hidroponia e em diferentes substratos sob ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 260-264, abr/jun. 2004.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

GERSHENZON J., MCCONKEY, M. E., CROTEAU, R. B. Regulation of Monoterpene Accumulation in Leaves of Peppermint. **Plant Physiology**, Washington, v. 122, n. 1, p. 205-214, Jan. 2000.

HARLEY, R. M. Evolution and distribution of *Eriope* (Labiatae) and its relatives in Brasil. In: WORKSHOP ON NEOTROPICAL DISTRIBUTION PATTERNS, 1988, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1988. 80p.

KUHNT, T.M.; PROBSTLE, A.; RIMPLER, H.; BAUER, R.; HEINRICH, M. Biological and pharmacological activities and further constituents of *Hyptis verticillata*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 61, n. 3, p. 227-232, 1995.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **PC version of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database**. Gaithersburg: Department of Commerce, 1998.

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

PHATAK, S.; HEBLE, M. R. Organogenesis and terpenoid synthesis in *Mentha arvensis*. **Fitoterapia**, Milan, v. 73, n. 1, p. 32-39, Feb. 2002.

SALES, J. F.; PINTO, J. E. B. P.; BOTREL, P. P.; OLIVEIRA, C. B. A.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; SERAPHIN, J. C. Composition and chemical variability in the essential oil of *Hyptis marrubioides* Epl. **Journal Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 19, n. 6, p. 552-556, Nov./Dec. 2007.

SANTOS, M. R. A.; INNECCO, R. Adubação orgânica e altura de corte da erva-cidreira brasileira. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 182-185, abr./jun. 2004.

SCAVRONI, J.; BOARO, C. S. F.; MARQUES, M. O. M.; FERREIRA, L. C. Yield and composition of the essential oil of *Mentha piperita* L. (Lamiaceae) grown with biossólido. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 4, p. 345-352, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2003. p. 467-496.

SOUZA, L. K. H.; OLIVEIRA, C. M. A.; FERRI, P. H.; OLIVEIRA, J. G.; SOUZA, A. H.; FERNANDES, O. D. L.; SILVA, M. D. R. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 7, p. 963-965, Oct. 2003.

SRIVASTAVA, N.K.; MISRA, A.; SHARMA, S. Variation among commercial cultivars of japanese mint (*Mentha arvensis* L.) in the morphological and metabolite characteres associated with essential oil yield. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 78, n. 2, p. 154-60, Mar. 2003.

TELICI, I.; SAHBAZ, N.; YILMAZ, G.; TUGAY, M. E. Agronomical and Chemical Characterization of Spearmint (*Mentha spicata* L.) Originating in Turkey, **Economic Botany**, New York, v. 58, n. 4, p. 721-728, Oct./Dec. 2004.

ARTIGO 3

TEOR E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Hyptis marrubioides* EPL., LAMIACEAE EM FUNÇÃO DA SAZONALIDADE

O artigo 3 foi encaminhado para submissão sendo aceito para publicação pelo Periódico Científico Acta Scientiarum Agronomy, Maringá, v. 4, 2009.

**Priscila Pereira Botrel¹; José Eduardo Brasil Pereira Pinto^{1*}; Vany Ferraz²;
Suzan Kelly Vilela Bertolucci¹; Felipe Campos Figueiredo³**

¹Universidade Federal de Lavras - Departamento de Agricultura, Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Mediciniais. Cx Postal 3037, CEP 37.200-000, Lavras – MG, *Autor para correspondência. E-mail. jeduardo@ufla.br, botrelpp@bol.com.br ²Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química - Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, CEP 31.270-901. Belo Horizonte – MG. ³Engº Agrônomo, DSc, Consultor e pesquisador da CAMPUS – Pesquisa, desenvolvimento e consultoria na agropecuária. E-mail. doutorfcf@yahoo.com.br

1 RESUMO

Os óleos essenciais são princípios odoríferos armazenados em células especiais da planta. O óleo essencial no gênero *Hyptis* é usado como anestésico, antiespasmódico, anti-inflamatório e pode induzir aborto em doses elevadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da sazonalidade no teor e composição do óleo essencial de *Hyptis marrubioides*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos (inverno, primavera, verão e outono), e seis repetições totalizando 60 plantas. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação, em aparelho de Clevenger. A análise qualitativa do óleo essencial foi por cromatografia em fase gasosa (CG/EM). Na estação do verão as folhas das plantas de *H. marrubioides* apresentaram os maiores teores de óleo essencial. Nas demais estações, os teores de óleo essencial obtidos foram semelhantes entre si. Os componentes majoritários no óleo essencial foram os monoterpenóides α -tujona e β -tujona. As concentrações relativas dos picos correspondentes à β -tujona não apresentaram diferenças consideráveis nas quatro estações. Os sesquiterpenóides oxigenados (cedrol e cariofileno) e não oxigenados (α -copaeno, α -cariofileno, germacreno D e cadaleno) foram encontrados em menores quantidades no óleo essencial, entretanto observam-se diferenças quantitativas ao longo das estações.

Palavras-chave: óleo essencial, avaliação sazonal, CG-EM.

CONTENT AND CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OIL OF *Hyptis marrubioides* AS RELATED TO SEASONALITY

2 ABSTRACT

Essential oils are odoriferous principles stored in special cells of the plants. The essential oil in the genus *Hyptis* is traditionally used as anesthetic, antispasmodic, anti-inflammatory and can induce abortion at high doses. The purpose of this work was to evaluate the influence of seasonality in the content and chemical composition of the essential oil of *H. marrubioides*. The experimental design was completely randomized with four treatments (winter, spring, summer and fall) and six replicates amounting to 60 plants. The essential oil was extracted by hydrodistillation with Clevenger apparatus. The qualitative analysis of the essential oil was performed by gas phase chromatography (GC/MS). In summertime, the leaves of the plants of *H. marrubioides* presented the highest contents of essential oil. In the other seasons, the contents of essential oil obtained were similar to one another. The major compounds in the essential oil were the monoterpenoids α -thujone and β -thujone. The relative concentrations of the peaks corresponding to β -thujone showed no marked differences in the four seasons. The oxygenated (cedrol and caryophyllenol) and non-oxygenated sesquiterpenoids (α -copaene, α -caryophyllene, germacrene D and cadalene) were found in lower amounts in the essential oil; however, quantitative differences were observed along the seasons.

Key-words: essential oils, seasonal evaluation, GC/MS.

3 INTRODUÇÃO

O gênero *Hyptis* Jacq. (Lamiaceae) inclui cerca de 300 espécies de ampla ocorrência na América tropical (Willis, 1973; Harley, 1988). Este gênero apresenta uma grande importância como fonte de constituintes bioativos, possuindo importantes efeitos biológicos, como atividades antimicrobianas, citotóxicas e inseticidas (Kuhnt et al., 1995). Estas espécies são bastante aromáticas e são freqüentemente usadas no tratamento de infecções gastrointestinais, câimbras e dores, bem como no tratamento de infecções de pele (Corrêa, 1931). Os óleos essenciais secretados por espécies desse gênero têm importante ação farmacológica, como anestésico, antiespasmódico, anti-inflamatório, além de abortivo em doses elevadas (Stasi et al., 1996).

A composição dos metabólitos secundários nas plantas é resultado do balanço entre a sua formação e transformação que ocorrem durante o crescimento em decorrência principalmente de três fatores: genéticos, ambientais e das técnicas de cultivo (Castro et al., 2002).

Dentro dos parâmetros climáticos, temperatura atmosférica e precipitação têm sido apontadas como fatores que influenciam a composição e conteúdo de óleo essencial em várias plantas aromáticas. Em estudos feitos por Ming et al. (2002) a produção de óleo essencial e a composição química de pimenta longa (*Piper aduncum* L.) em Adrianópolis, PR, durante 15 meses tiveram os maiores teores de setembro a dezembro/2000 e janeiro a março/2001. Neste período, as temperaturas foram mais altas e houve maior precipitação em relação aos demais meses do ano. Quanto à qualidade do óleo, o menor percentual de trans-ocimeno e cis-ocimeno foi verificado em outubro/2000 (11,23% e 3,75%) respectivamente e, a partir daí, houve um aumento da sua concentração no óleo essencial, mesmo nos meses de temperatura mais baixas.

Os principais constituintes químicos encontrados por Sales et al. (2007) em *H. marruboides*, ao estudar a variabilidade química presente no óleo essencial desta espécie em duas localidades do Sul de Minas Gerais, foram: cariofila-4(14),8(15)-dien-5 β -ol, eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol, óxido de cariofileno e (β)-cariofileno.

Poucas são as informações encontradas relatando estudos fitotécnicos com esta espécie, e determinar a época de colheita em função da produção de princípios ativos é fundamental no manejo de plantas medicinais. Assim, este trabalho tem como objetivo estudar a variação sazonal no teor e composição do óleo essencial em folhas de *H. marruboides*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e condições climáticas do experimento

O presente trabalho foi conduzido em Lavras, MG no Horto de Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura/UFLA.

A extração do óleo foi feita no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas medicinais/UFLA, e a análise da composição química no Laboratório de cromatografia gasosa do Departamento de Química da UFMG.

O município de Lavras localiza-se na região Sul de Minas Gerais. Situa-se a 21°14' de Latitude Sul e 45°00' de Longitude Oeste de Greenwich a uma altitude de 918 m. Segundo a classificação de Koppen, o clima enquadra-se no tipo Cwa, temperado úmido, com verão quente e inverno seco (Tabela 1).

TABELA 1 Dados climatológicos das estações do ano para Lavras - Sul de Minas Gerais. 2004-2005.

Estação	Período	Temperatura (°C)			Precipitação total (mm)	UR (%)	Insolação (horas)	CLA* (mm)
		máx	mín	méd				
Primavera	23/09/04 a 21/12/04	27,9	16,9	21,3	693,1	72,4	6,0	5,3
Verão	22/12/04 a 19/03/05	28,7	18,1	22,3	882,1	78,5	6,0	4,9
Outono	20/03/05 a 20/06/05	26,8	15,8	20,2	279,8	75,7	7,0	3,8
Inverno	21/06/05 a 22/09/05	26,1	13,0	18,5	131,6	68,5	7,3	4,0

*Tanque classe A

4.2 Propagação e cultivo

A propagação de *H. marruboides* foi feita por sementes e o transplântio das mudas, para o campo foi realizado em 24 de março de 2004 quando as plantas tinham 60 dias de idade. Cada parcela experimental foi constituída de 15 plantas úteis, com quatro repetições oriundas da amostragem composta dessas plantas. As quatro estações do ano constituíram as épocas correspondentes aos tratamentos. Utilizaram-se 36 plantas de bordadura e 60 plantas de área útil, totalizando 96 mudas de *H. marruboides*. Após o plantio foram sorteadas as 15 mudas que representaram cada época constituindo um delineamento inteiramente casualizado (DIC).

Os dados do teor de óleo essencial foram submetidos a análise de variância utilizando-se o software SISVAR (Ferreira, 2000) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

4.3 Coleta e preparo das amostras

A colheita de folhas frescas foi realizada na metade do período de cada estação iniciada 220 dias após transplântio na estação da primavera, por volta das dez horas da manhã. Foram coletadas folhas das porções médias dos ramos

não floridos das plantas situados nas direções cardeais: N, S, L e W. As folhas foram secas em estufa de circulação forçada de ar à 40°C. Para cada repetição utilizaram-se 25g de massa seca de folhas inteiras.

4.4 Extração do óleo essencial

. A extração do óleo essencial foi realizada pelo método de hidrodestilação em aparelho de Clevenger, por um período de duas horas a partir da ebulição.

Para a purificação do óleo essencial, o hidrolato foi submetido à partição líquido-líquido em funil de separação, realizando-se três lavagens do hidrolato com três porções de 20 mL de diclorometano por meia hora cada. As frações orgânicas foram reunidas e secas com sulfato de magnésio anidro, deixando-o agir por quatro horas e, posteriormente, o sal foi removido por filtração simples e o solvente foi evaporado à temperatura ambiente sob capela de exaustão de gases.

Diante da massa obtida, determinou-se o teor percentual do óleo essencial pela fórmula: $T\% = \text{Massa do óleo (g)} / 25\text{g} \times 100$.

4.5 Composição química do óleo essencial

A composição química dos óleos essenciais não pôde ser comparada estatisticamente pelo teste de Scott-Knott, pois foi analisada somente uma amostra composta formada pelo agrupamento das repetições de cada tratamento.

As amostras foram analisadas por cromatografia em fase gasosa (Varian CP-3380) equipado com detector de ionização de chamas, coluna capilar SE-54, 30 m x 0,32 mm (Alltech, Deerfield, TI, USA) e hidrogênio como gás de arraste (2 mL/min). A temperatura da coluna foi programada na faixa de 40°C até 180°C, com uma variação de 5°C/min. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 250°C. Foi injetado 1 µL de amostra no modo split (1/100). As

concentrações relativas (%) correspondentes aos componentes do óleo essencial foram calculadas utilizando o *software* Varian Star 5.52. A identificação dos picos foi realizada por comparação dos índices de retenção calculados a partir de uma série n-alcenos (C9 a C17) com dados de literatura (Davies, 1989; NIST, 2005).

A identificação dos componentes foi posteriormente confirmada utilizando cromatografia em fase gasosa Hewlett-Packard 6890 acoplado a um espectrômetro de massas Hewlett-Packard 5989A e programa MS Chemstation (HP), coluna capilar SE-54, 30m x 0,32mm (Alltech, Deerfield, TI, USA) e hélio como gás de arraste (2ml/min). A temperatura da coluna foi programada para 40°C (3 min) até 180°C, 5°C/min. A temperatura do injetor, interface e fonte de íons foram mantidas a 250°C. Os espectros foram obtidos por impacto eletrônico (IE) a 70 eV. Os componentes foram identificados por comparação dos espectros de massa obtidos com os espectros do banco de dados Wiley 138 e pelo site webbook.nist.gov.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teor de óleo essencial em folhas de *H. marruboides*

Houve diferença nos teores de óleo essencial nas diferentes estações do ano. O inverno foi a estação onde se obteve os menores teores de óleo, com uma redução equivalente a 36% em relação ao teor observado na estação do verão. No outono essa queda foi de 21,4% e na primavera de 16,6%. Apesar destas diferentes reduções nos teores de óleo, as estações do inverno, primavera e outono não diferenciaram estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (Figura 1).

O início do florescimento da *H. marrubioides* se deu na estação da primavera e atingiu seu auge no verão. Na estação de outono as folhas das plantas estavam entrando em senescência fato que se agravou no inverno quando a maioria das plantas estava praticamente sem folhas. Essa observação pode ajudar a explicar os resultados, visto que no inverno houve o menor teor de óleo essencial.

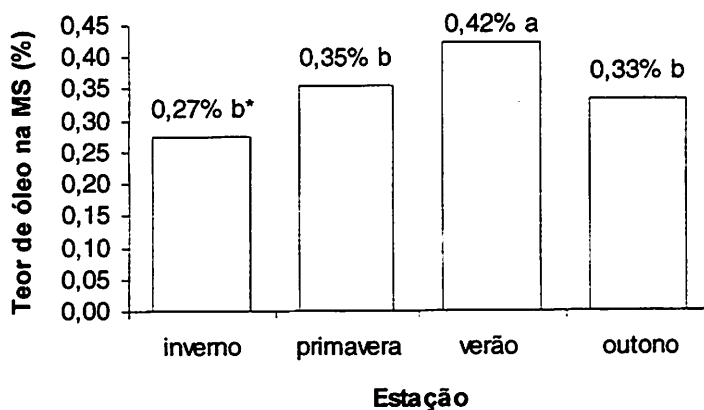


FIGURA 1 Teores médios de óleo essencial (%) na biomassa seca de folhas de *Hyptis marrubioides* em função de diferentes estações do ano. *As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott.

No verão foi obtido o maior teor de óleo essencial, período em que as plantas se encontravam em pleno florescimento e com os ramos cheios de folhas. Acredita-se que este resultado pode estar sendo influenciado pelo maior comprimento dos dias de verão que conseqüentemente traz melhores condições para o desenvolvimento vegetativo das plantas.

Trabalhos de Ventrella & Ming (2000), com erva cidreira (*Lippia alba*), concluíram que na primavera o teor de óleo foi mínimo. Porém, no verão, o teor de óleo essencial também foi maior em comparação as demais estações do ano.

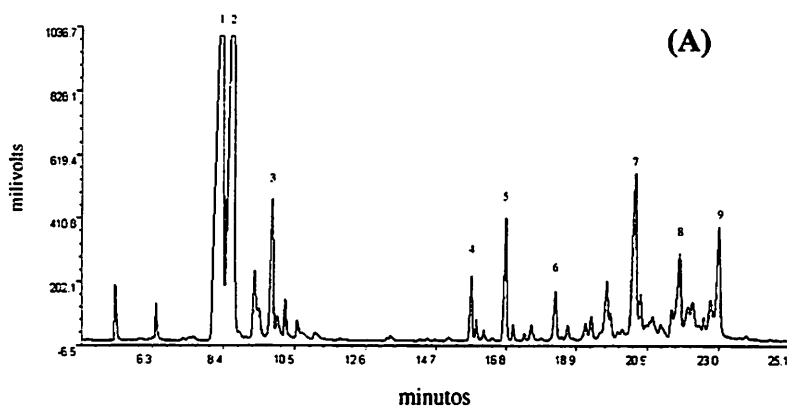
A redução dos teores de óleo essencial, principalmente no inverno e outono, pode ser explicada pelo acionamento do mecanismo natural de feedback que degrada metabólitos secundários e direciona seus compostos químicos para a manutenção do metabolismo primário (Taiz & Zeiger, 2004).

Segundo Costa et al. (2004) no inverno ocorreu menor produção de óleo essencial de capim citronela (*Cymbopogon nardus*), considerando São Cristóvão-SE, a região onde foi realizado o experimento, caracterizada por inverno chuvoso. A região de Lavras, Sul de Minas Gerais é caracterizada por invernos secos, onde a estação mais chuvosa é o verão, no entanto as condições climáticas desse experimento diferem das condições deste trabalho, o que não nos permite dizer que os resultados encontrados são semelhantes.

Akrout et al. (2003) estudando a variação sazonal do óleo essencial de partes aéreas de *Artemisia campestris* L., concluíram que o rendimento de óleo essencial foi maior em agosto (1,2%) e menor em novembro (0,65%).

5.2 Análise da composição química do óleo essencial de *H. marrubioides*

Na Figura 2 estão representados os cromatogramas do óleo essencial de *H. marrubioides*, referentes às quatro estações do ano, indicando apenas os componentes majoritários identificados.



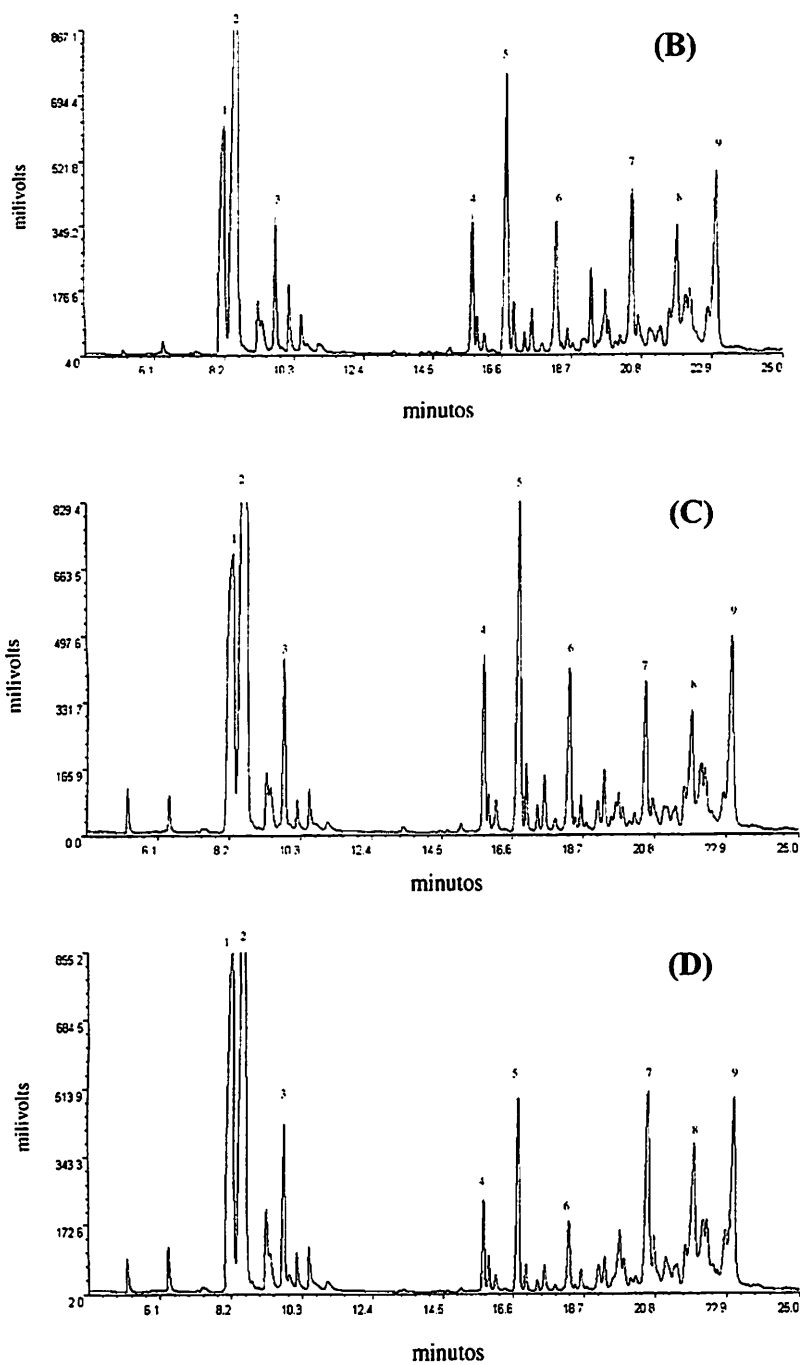


FIGURA 2 Cromatogramas obtidos por CG-EM para análise da composição química do óleo essencial de *H. marruboides*. (A) inverno; (B) primavera; (C) verão e (D) outono. Picos: (1) α -tujona; (2) β -tujona; (3) linalol; (4) α -copaeno; (5) α -cariofileno; (6) germacreno D; (7) cariofilenol; (8) cedrol; (9) cadaleno.

Os dados obtidos das determinações qualitativas e quantitativas dos componentes principais presentes no óleo essencial de *H. marrubioides* estão apresentados na Tabela 2. Esses componentes representaram aproximadamente 75% da composição química do óleo nas estações. Não foi observada variação qualitativa na composição do óleo essencial de *H. marrubioides* ao longo das estações. Os componentes majoritários do óleo essencial de *H. marrubioides* nas quatro estações foram os monoterpenóides α -tujona e β -tujona. Os picos correspondentes à β -tujona não apresentaram diferenças consideráveis nas concentrações relativas (%) durante as estações do ano. Ao contrário do que foi observado para os picos correspondentes à α -tujona que apresentou concentração relativa de 26,7% no inverno e 11,1% na primavera, representando uma queda superior a 50% desse componente nessas estações.

Blank et al. (2007) avaliando diferentes horários e épocas de colheita de folhas de citronela de java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt), concluíram que a época seca reduziu o conteúdo de limoneno, citronelol, geraniol e farnesol, e aumentou o conteúdo de citronelal e neral. Para esta espécie a sazonalidade afetou significativamente a qualidade do óleo essencial.

Ao contrário de *H. marrubioides*, sesquiterpenos oxigenados foram os constituintes majoritários encontrados na maioria das populações de plantas de *Hyptis suaveolens* do cerrado brasileiro em estudos realizados por Azevedo et al. (2002).

Sales et al. (2007) estudando o óleo essencial de *H. marrubioides* de caules e folhas (frescos, secos e inteiros ou em pedaços) coletados em duas localidades do Sul de Minas Gerais, identificaram 26 compostos que representaram 96-99% dos constituintes voláteis. Sesquiterpenos oxigenados foram os principais grupos de constituintes na maioria das populações (52,9-93,2%).

A presença de sesquiterpenos oxigenados (cedrol e cariofileno) e não oxigenados (α -copaeno, α -cariofileno, germacreno D e cadaleno) também foram identificados no óleo essencial de *H. marruboides*, os quais apresentaram diferenças nas concentrações relativas durante as épocas avaliadas, com valores entre 1,6 a 9,8%.

Com exceção do cadaleno, os teores dos principais sesquiterpenos não oxigenados identificados no óleo de *H. marruboides* no presente trabalho, apresentaram maiores concentrações relativas nas estações de verão e primavera. Destacam-se os valores de 9,8 e 9,2% obtidos para o α -cariofileno, respectivamente, no verão e na primavera.

Na estação da primavera os teores de monoterpenos e sesquiterpenos apresentaram valores bastante próximos, no entanto no inverno o teor de monoterpenos dobrou em relação aos sesquiterpenos (Tabela 2).

Experimentos com *H. suaveolens* sob diferentes condições nutricionais, fotoperíodo e épocas de colheita indicaram interferências de fatores ambientais na composição química do óleo essencial dessa planta (Martins et al., 2006). Já em *H. marruboides* pelo fato de terem ocorrido apenas variações nas concentrações relativas (%) dos fitoconstituintes presentes no óleo, parece que as variações ambientais ocorridas durante as estações do ano são pouco expressivas para provocar variações qualitativas na composição do óleo.

Tais variações provavelmente estejam relacionadas ao ciclo fisiológico da planta, pois no inverno, período de baixa atividade biossintética, os sesquiterpenos totais (compostos de síntese mais complexa) apresentaram teor cerca de 20% contra o valor de 54 % de monoterpenos totais no mesmo período. Essa diferença estreitou durante as demais estações, sendo que na primavera a relação de monoterpenos e sesquiterpenos totais foi quase de 1:1.

Para atestar as hipóteses sobre os parâmetros que interferem na variabilidade da composição química do óleo essencial de *H. marruboides*,

BIBLIOTECA CENTRAL - UFLA

sugere-se a realização de novos trabalhos levando-se em consideração os aspectos genéticos, fisiológicos e edafo-climáticos.

TABELA 2 Porcentagem dos componentes do óleo essencial de folhas de *H. marrubioides* nas quatro estações do ano.

Nº Pico	IR*	Componente	Classe	Concentrações relativas (%)			
				Inverno	Primavera	Verão	Outono
1	1077	α -tujona	monoterpeno	26,7	11,1	14,5	18,3
2	1090	β -tujona	monoterpeno	23,1	23,7	25,9	24,4
3	1138	linalool	monoterpeno	4,3	3,04	3,31	3,61
4	1369	α -copaeno	sesquiterpeno	1,6	3,46	3,87	1,83
5	1409	α -cariofileno	sesquiterpeno	3,6	9,21	9,76	4,67
6	1467	germacreno D	sesquiterpeno	1,6	4,63	4,67	1,82
7	1560	cariofilenol	sesquiterpeno	6,9	5,14	3,82	6,79
8	1610	cedrol	sesquiterpeno	3,8	5,16	4,16	5,76
9	1655	cadaleno	sesquiterpeno	4,7	7,68	6,93	7,23
Total dos picos dos monoterpenos (%)				54,1	37,8	43,7	46,3
Total dos picos dos sesquiterpenos (%)				22,2	35,3	33,2	28,1
Total dos picos majoritários (%)				76,3	73,12	76,92	74,41

*IR: Índice de retenção.

6 CONCLUSÕES

Não ocorreram diferenças qualitativas no óleo essencial de *H. marrubioides* ao longo das estações do ano, mas há diferenças nas concentrações relativas (%). No verão ocorreu o maior teor de óleo e no inverno obteve-se a maior concentração relativa (%) dos componentes majoritários α e β -tujona.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKROUT, A.A.; CHEMLI, R.; SIMMONDS, M.; KITE, G.; HAMMAMI, H.; CHIEF, T. Seasonal variation of the essential oil of *Artemisia campestris* L. **Journal Essential Oil Research**, Carol Stream, v.15, n. 5, p. 333-336, Sept./Oct. 2003.

AZEVEDO, N.R.; CAMPOS, I. F. P.; FERREIRA, H. D.; PORTES, T. A.; SERAPHIN, J. C.; PAULA, J. R.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H. Essential oil chemotypes in *Hyptis suaveolens* from Brazilian Cerrado. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 205–216, Mar. 2002.

BLANK, A. F.; COSTA, A. G.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; CAVALCANTI, S. C. H.; ALVES, P. B.; INNECCO, R.; EHLET, P. A. D.; SOUZA, I. F. Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 557-564, Oct./Dec. 2007.

CASTRO, D. M.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M. Composição fitoquímica dos óleos essenciais de folhas da *Lippia alba* (Mill). N.E.Br em diferentes épocas de colheita e partes do ramo. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 4, n. 2, p. 75-9, 2002.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1931.

COSTA, A.G.; CARVALHO FILHO, J. L. S.; SANTANA FILHO, L. G. M.; OLIVEIRA, A.S.; SANTOS, M.F.; BLANK, A. F. Influência da época, do horário de colheita e da secagem de folhas no teor e rendimento de óleo essencial de capim citronela. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, jul. 2004. Suplemento 2.

DAVIES, N.W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. **Journal Chromatography**, Amsterdam, p. 1-24, 1989.

DI STASI, L.C.; LIMA, C.A.H.; MARIOT, A.; PORTILHO, W.G.; REIS, M.S. **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996.

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, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-228.

HARLEY, R.M. Evolution and distribution of *Eriope* (Labiatae) and its relatives in Brasil. In: WORKSHOP ON NEOTROPICAL DISTRIBUTION PATTERNS, 1988, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1988. p. 71-80.

KUHNT, T.M.; PROBSTLE, A.; RIMPLER, H.; BAUER, R.; HEINRICH, M. Biological and pharmacological activities and further constituents of *Hyptis verticillata*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 61, n. 3, p. 227-232, 1995.

MARTINS, E.R. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: UFV, 1994.

MARTINS, F.T.; SANTOS, M. H.; POLO, M.; BARBOSA, L. C. A. Variação química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) POIT. sob condições de cultivo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1203-1209, Nov./dez. 2006.

MING, L.C.; CHAVES, F. C. M.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Produção sazonal de óleo essencial em uma população natural de *Piper aduncum* L. em Adrianópolis – PR. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, jul. 2002. Suplemento 2.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. "Retention Indices". In: P.J. LINSTROM, P.J.; MALLARD, W.G. (Ed.), **Chemistry WebBook: NIST Standard Reference Database Number 69**. Gaithersburg: National Institute of Standards and Technology, 2005. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov>>. Acesso em: 28 jan. 2007.

SALES, J. F.; PINTO, J. E. B. P.; BOTREL, P. P.; OLIVEIRA, C. B. A.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; SERAPHIN, J. C. Composition and chemical variability in the essential oil of *Hyptis marruboides* Epl. **Journal Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 19, n. 6, p. 552-556, Nov./Dec. 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabolismo secundário. Terpenos. Compostos fenólicos. Compostos nitrogenados. In: _____. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 13, p. 313-332.

VENTRELLA, M.C.; MING, L.C. Produção de matéria seca e óleo essencial em folhas de erva cidreira sob diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 972-974, 2000. Suplemento.

WILLIS, J.C. **Dictionary of flowering plants and ferns**. London: Columbia University, 1973.

ARTIGO 4

EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Hyptis marrubioides* EPL. SOBRE *Atta sexdens rubropilosa* FOREL (Hymenoptera: Formicidae)

O artigo 4 será transcrito no formato do Periódico Científico Ciência e Agrotecnologia e encaminhado para submissão

1 RESUMO

Métodos químicos têm sido largamente empregados para o controle de formigas cortadeiras, no entanto, têm acarretado sérios problemas à saúde humana, assim como para o meio ambiente e outros organismos não-alvo. Espécies de plantas medicinais têm sido estudadas na tentativa de descobrir novas moléculas inseticidas. O presente trabalho objetiva avaliar a mortalidade de formigas cortadeiras (*Atta sexdens rubropilosa* Forel) através da aplicação tópica do óleo essencial de *Hyptis marrubioides*. O delineamento experimental foi em parcelas subdivididas contendo 11 concentrações de óleo essencial, quatro repetições com 10 formigas cada, e quatro tempos (dias de avaliação). A aplicação do óleo essencial foi realizada utilizando uma microseringa, de modo a fornecer 1 µL do óleo essencial em cada formiga. As avaliações foram feitas a cada 24 horas, registrando-se o número de formigas mortas, por um período de 96 horas. A aplicação tópica do óleo essencial de *H. marrubioides* foi tóxica para formigas cortadeiras, e o tempo letal (TL₅₀) foi de 17 horas e 39 minutos na concentração de 38,34% de óleo essencial.

Palavras-chave: planta medicinal, inseticida natural, *Atta* spp.

EFFECT OF THE ESSENTIAL OIL OF *Hyptis marrubioides* EPL. ON *Atta sexdens rubropilosa* FOREL (Hymenoptera: Formicidae)

2 ABSTRACT

Chemical methods have been widely employed for cutting ant control; nevertheless, they have brought about serious problems to human health as well as to environment and others non-target organisms. Species of medicinal plants have been studied in the effort of discovering new insecticidal molecules. The resent work aims to evaluate the mortality of cutting ants (*Atta sexdens rubropilosa* Forel) trough the topic application of essential oil of *H. marrubioides*. The experimental design was in split plot containing 11 concentrations of essential oil, four replicates with 10 ants each and four times (evaluation days). The application of the essential oil was performed by using a microsyringe in order to furnish 1 µl of oil in each ant. The evaluations were done every 24 hours, recording the number of dead ants for a 96 -hour period. The topic application of the essential oil of *H. marrubioides* was toxic to the leaf-cutting ants and the lethal time (LT₅₀) was of 17 hours and 39 minutes at the concentration of 38.34% of essential oil.

Key-words: medicinal plants, natural insecticide, *Atta* spp.

3 INTRODUÇÃO

O gênero *Hyptis* Jacq (Lamiaceae) inclui cerca de 300 espécies de ampla ocorrência na América Tropical (Willis, 1973; Harley, 1988). Plantas desse gênero apresentam grande importância como fonte de constituintes bioativos, possuindo vários efeitos biológicos, como atividades antimicrobianas, citotóxicas e inseticidas (Kuhnt et al., 1995).

As formigas cortadeiras pertencem à ordem Hymenoptera, família Formicidae. São insetos causadores de danos à agricultura, sendo que a importância do seu estudo deve-se aos prejuízos causados às plantações, ao elevado número de colônias que uma determinada área pode apresentar e ao controle difícil e oneroso das mesmas (Ribeiro, 2002).

No Brasil, a utilização de formas alternativas de controle de pragas vem crescendo em substituição aos inseticidas altamente tóxicos ao homem e ao meio ambiente (Fernandes et al., 2006), mas ainda em pequenas proporções.

A utilização de produtos naturais de origem vegetal com ação tóxica às formigas e/ou ao fungo simbiote é uma perspectiva na busca de um método eficaz de controle dessa praga. Nesse contexto, Almeida et al. (2007) avaliaram a toxicidade de extratos, frações e substâncias puras de *Helietta puberula* RE Fr. (Rutaceae) para operárias de *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) e para o seu fungo simbiote, *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. Os resultados mostraram que dentre as seis substâncias isoladas de *H. puberula*, três delas foram concomitantemente tóxicas para as saúvas e para o fungo, mostrando ser essa espécie vegetal uma fonte promissora de novas substâncias para o controle de formigas cortadeiras.

A ação tóxica de produtos naturais aos insetos geralmente ocorre por diversos mecanismos, porém, pode ser específica a determinado grupo de insetos. Esta pode ser constatada por meio de bioensaios onde as substâncias

naturais são aplicadas topicamente ou por ingestão (Bueno et al., 1990). Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do óleo essencial de *H. marruboides* na mortalidade de formigas cortadeiras através de aplicação tópica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em Laboratório de Seletividade do Departamento de Entomologia da UFLA. A extração do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais da UFLA, pelo método de hidrodestilação em aparelho de Clevenger, por uma hora e meia. As folhas e inflorescências de *H. marruboides* utilizadas para extração do óleo foram coletadas de plantas localizadas no campo experimental na Fazenda Gota da Esperança, UFLA, 15 meses após o plantio.

As formigas cortadeiras foram coletadas em um eucaliptal isento de contaminação química dentro do Campus da UFLA. Para a realização dos bioensaios, as formigas operárias foram acomodadas em placas de Petri e mantidas em câmara climática com temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas. Foram utilizadas placas de Petri de 10 cm de diâmetro forradas com papel-filtro, contendo 10 formigas. Cada placa continha dieta artificial constituída de 5 g de glicose; 0,1 g de lêvedo de cerveja; 1,5 g de ágar e 1 g de peptona bacteriológica dissolvidos em 100 mL de água destilada. A cada 2 dias, foi feita a troca da dieta para evitar contaminação.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com parcelas subdivididas no tempo, contendo 11 concentrações de óleo essencial, com quatro repetições, totalizando 44 parcelas. Utilizou-se o óleo essencial nas concentrações de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50%. Em todas as

concentrações, foi feita uma diluição do óleo essencial em acetona, sendo que na concentração 0% (testemunha), aplicou-se apenas acetona no dorso das formigas. Para facilitar a manipulação das formigas, estas foram desmaiadas por meio de CO₂ por cerca de 30 segundos. Na aplicação foi utilizada uma microseringa, de modo a fornecer 1 µL do óleo essencial por formiga.

As avaliações foram realizadas a cada 24 horas, registrando-se o número de formigas mortas em cada placa, por um período de 96 horas.

Com os dados obtidos nas avaliações foram realizadas as análises estatísticas pelo programa SISVAR (Ferreira, 2000). Desta análise foram gerados os modelos de mortalidade de formigas de onde foi calculado o tempo letal de mortalidade de 50% da população (TL₅₀). Com os valores obtidos foi plotado um novo gráfico relacionando a TL₅₀ com as concentrações de óleo utilizadas ajustando um novo modelo a estes dados de modo a estimar a concentração mais letal às formigas.

De forma complementar, foi avaliado a evolução da mortalidade das formigas que foi medida pelo cálculo da área abaixo da curva de progressão da mortalidade de formigas (AACPMF) segundo a seguinte fórmula modificada de Campbell & Madden (1990): $AACPMF = \sum \{ [(mortalidade\ atual + mortalidade\ anterior) / 2] * intervalo\ entre\ avaliações \}$ que após análise estatística pelo programa SISVAR (Ferreira, 2000) e teste de média obteve qual a concentração mínima que proporcionou a mortalidade semelhante à melhor.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com as análises estatísticas, a interação entre concentrações e dias de avaliação foi significativa. No entanto foi realizada análise de regressão para os dias de avaliação dentro de cada concentração de óleo essencial aplicada.

Na Tabela 1, estão representadas as equações dos modelos de regressão para cada concentração de óleo essencial. A partir dessas equações, foram calculados os tempos letais de mortalidade (TL₅₀), que podem ser observados na Figura 1, onde o ponto mínimo estimado ocorreu na concentração de 38,34% de óleo essencial, com TL₅₀ estimada de 17 horas e 39 minutos após aplicação do óleo essencial. Porém, ao realizar a análise da área abaixo da curva de progressão de mortalidade de formigas (AACPMF), pode-se observar que, a concentração de 25% de óleo essencial foi semelhante às concentrações de 30, 35, 40, 45 e 50% (Figura 2).

TABELA 1 Equações dos modelos de regressão para os dias avaliados dentro de cada concentração de óleo essencial de *Hyptis marruboides*.

Concentração óleo essencial (%)	Modelos da regressão	R ²
0%	$y = -13,75 + 9,50x$	R ² = 80,22%
5%	$y = -15,0 + 13,0x$	R ² = 92,60%
10%	$y = -7,50 + 9,25x$	R ² = 91,57%
15%	$y = -16,25 + 16,75x$	R ² = 94,80%
20%	$y = -27,5 + 59,5x - 7,5x^2$	R ² = 99,81%
25%	$y = 10,0 + 62,0x - 10,0x^2$	R ² = 93,33%
30%	$y = -3,13 + 67,88x - 10,63x^2$	R ² = 96,68%
35%	$y = -31,25 + 87,25x - 13,75x^2$	R ² = 96,06%
40%	$y = 19,38 + 52,38x - 8,13x^2$	R ² = 97,42%
45%	$y = 10,0 + 62,0x - 10,0x^2$	R ² = 93,33%
50%	$y = 15,63 + 58,13x - 9,38x^2$	R ² = 93,33%

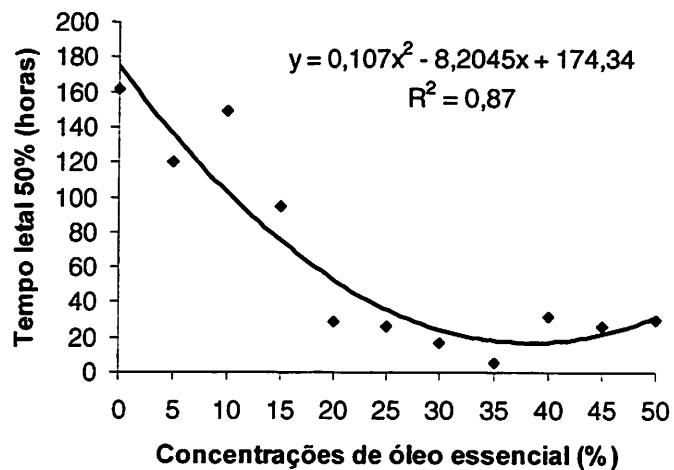


FIGURA 1 Tempo Letal (TL₅₀) para mortalidade de formigas cortadeiras, em função das concentrações aplicadas de óleo essencial de *Hyptis marruboides*.

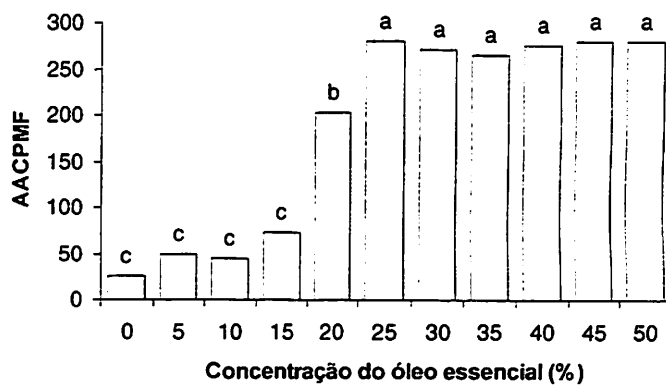


FIGURA 2 Área abaixo da curva de progressão de mortalidade de formigas cortadeiras em função das concentrações de óleo essencial de *Hyptis marruboides*.

Diversos produtos naturais aplicados em formigas cortadeiras têm mostrado ação inseticida e/ou fungicida (Pagnocca et al., 1996; Bueno et al., 2005) entre outros. Howard et al. (1988) testando a ação de terpenóides deterrentes sobre operárias de *Atta cephalotes*, em condições de laboratório, observaram que as formigas sobreviveram no máximo 10 dias, quando mantidas com dieta artificial líquida desenvolvida por Boyd & Martin (1975), composta de 9% de glicose, 1% de peptona bacteriológica e 0,1% de complexo vitamínico.

Godoy et al. (2005) isolaram oito cumarinas de quatro espécies de plantas e avaliaram o efeito no desenvolvimento do fungo simbiote das formigas cortadeiras *Atta sexdens*. Com exceção da clausarina, todas as outras cumarinas foram inibitórias de 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sendo que a xantiletina inibiu o fungo na concentração de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Em um estudo fitoquímico de *Simarouba versicolor* St. Hil. (Simaroubaceae) associado ao controle de formigas cortadeiras, os extratos hexânico foram os que apresentaram resultados menos promissores, uma vez que, não mataram as formigas. Já os extratos diclorometânicos e metanólicos das folhas, caule e galhos de *S. versicolor* apresentaram bons resultados, onde através das curvas de sobrevivência, alguns desses extratos, mataram as formigas já no 6º dia, sendo o controle utilizado de 16 dias (Simote et al., 2004). Para *H. marrubioides*, observou-se que o tempo letal (TL_{50}) estimado foi de 17 horas e 39 minutos após aplicação do óleo essencial. Um fato interessante é que, imediatamente após a aplicação do óleo essencial de *H. marrubioides* ocorreu alto grau de excitação das formigas cortadeiras, sendo que a partir da concentração de 30%, observaram-se multilamentos de formigas.

Existem diversos trabalhos que investigaram a resistência de espécies ou procedências de eucaliptos ao corte por formigas (Santana & Anjos, 1989; Della Lucia et al., 1995) De maior importância, no entanto, é a perspectiva de que novas moléculas sejam obtidas desses estudos. Por exemplo, o trabalho de

Santana & Anjos (1989) indicou comportamento deletério das operárias quando expostas a, pelo menos, quatro espécies de eucalipto. Posteriormente, Marsaro Júnior et al. (2004) identificaram o composto químico responsável por essa perturbação em formigueiros de *Atta* spp.

O óleo essencial da espécie *H. marrubioides* apresentou um efeito tóxico sobre a formiga cortadeira. No entanto, trabalhos futuros deverão ser realizados a fim de isolar os compostos presentes nesta espécie, e inferir hipóteses relacionadas a ações biológicas desta espécie no controle de insetos.

6 CONCLUSÕES

O óleo essencial de *H. marrubioides* aplicado no dorso da saúva-limão foi tóxico, e o tempo letal (TL₅₀) foi de 17 horas e 39 minutos na concentração de 38,34%.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R. N. A.; PEÑAFLORES, M. F. G. V.; SIMOTE, S. Y.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. Toxicity of Substances Isolated from *Helietta puberula* RE Fr. (Rutaceae) to the Leaf-cutting Ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the Symbiotic Fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **BioAssay**, Piracicaba, v. 2, p. 2-8, 2007.

BOYD, N. D.; MARTIN, M. M. Faecal proteinases of the fungus-growing ant *Atta texana*: their fungal origin and ecological significance. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 21, n. 12, p. 1815-1820, Dec. 1975.

BUENO, F.C.; GODOY, M.P.; LEITE, A.C.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C.; FERNANDES, J.B.; HEBLING, M.J.A.; BACCI, M.; VIEIRA, P.C.;

SILVA, M.F.G.F. Toxicity of *Cedrela fissilis* to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and its symbiotic fungus. **Sociobiology**, Chicago, v. 45, n. 2, p. 389-399, 2005.

BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A.; CASTRO, S.L.R.; SILVA, O.A.; PAGNOCCA, F.C.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C. Toxic effect of plants on leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. In: VANDER MEER, R.K.; JAFFE, K.; CEDENO, A. (Ed.). **Applied myrmecology: a world perspective.**, San Francisco: Westview, 1990. p. 420-423.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology.** New York: J.Wiley, 1990.

DELLA LUCIA, T.M.C.; OLIVEIRA, M.A.; ARAÚJO, M.S. Avaliação da não-preferência da formiga cortadeira *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel ao corte de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 19, n. 1, p. 92-99, jan./mar. 1995.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p.255-258.

FERNANDES, J. M.; SERIGATTO, E. M.; LUCA, A. S. de; EGEWARTH, R. E. 2006. Efeito de soluções de origem vegetal na herbivoria de duas espécies de tanchagem (*Plantago major* L. e *Plantago lanceolata* L.). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 6, n. 2, p. 35-41, 2006.

GODOY, M. F. P.; VICTOR, S. R.; BELLINI, A. M.; GUERREIRO, G.; ROCHA, W. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JÚNIOR, M.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; PAGNOCCA, F. C., Inhibition of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants by coumarins. **Journal Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n. 3B, p. 669-672, May/June 2005.

HARLEY, R.M. Evolution and distribution of *Eriope* (Labiatae) and its relatives in Brasil. In: WORKSHOP ON NEOTROPICAL DISTRIBUTION PATTERNS, 1988, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1988. p. 71-80.

HOWARD, J.J.; GREEN, T.P.; WIEMER, D.F. Comparative deterrence of two terpenoids to two genera of attine ants. **Journal of Chemical Ecology**, Heidelberg, v. 15, n. 9, p. 2279-2288, Sept. 1988.

KUHNT, T.M.; PROBSTLE, A.; RIMPLER, H.; BAUER, R.; HEINRICH, M. Biological and pharmacological activities and further constituents of *Hyptis verticillata*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 61, n. 3, p. 227-232, 1995.

MARSARO JÚNIOR, A. L.; SOUZA, R. C.; DELLA LUCIA, T. M. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. ; VIEIRA, P. C. Behavioral changes in workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* induced by chemical components of *Eucalyptus maculata* leaves. **Journal of Chemical Ecology**, Heidelberg, v. 30, n. 9, p. 1771-1780, Sept. 2004.

SANTANA, D.L.Q.; ANJOS, N. Resistência de *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae) à *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 13, n. 2, p. 174-181, Jul./Dez. 1989.

SIMOTE, S. Y.; GOMES, F.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; BUENO, O. C. Estudo fitoquímico de *Simarouba versicolor* associado ao controle de formigas cortadeiras. In: REUNIÃO ANUAL SOBRE EVOLUÇÃO, SISTEMÁTICA E ECOLOGIA MICROMOLECULARES, 19., 2004, Niterói. **Resumos...** Niterói: Instituto de Química, 2004.

PAGNOCCA, F.C.; TORKOMIAN, V.L.V.; HEBLING, M.J.A.; BUENO, O.C.; SILVA, O.A.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; SILVA, M.F.G.F. da; FERREIRA, A.G. Toxicity of lignans to symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Journal of Chemical Ecology**, Heidelberg, v. 22, n. 7, p. 1325-1330, July 1996.

RIBEIRO, T.A.N. **Estudo químico-farmacológico das raízes de *Spiranthera Odoratissima* St. Hill.** Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá.

WILLIS, J.C. **Dictionary of flowering plants and ferns.** London: Columbia University, 1973.