

**MARCELO MOREIRA FREIRE**

**COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE HORTELÃ-PIMENTA (*Mentha piperita* L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2006

**MARCELO MOREIRA FREIRE**

**COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE HORTELÃ-PIMENTA (*Mentha piperita* L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2006.

---

Elson Santiago de Alvarenga, Ph. D.  
(Conselheiro)

---

Mayura Marques Magalhães Rubinger, Ph. D.

---

Onkar Dev Dhingra, Ph. D.  
(Conselheiro)

---

Sérgio Tinôco Verçosa de Magalhães, D. S.

---

Gulab Newandram Jham, Ph. D.  
(Orientador)

À minha querida esposa Aline, companheira e amiga de todas as horas e aos meus pais, Evaristo e Anatália, pelo apoio, incentivo e amor, especialmente nos momentos difíceis,

DEDICO.

A todos, que de uma forma ou outra, muito contribuíram para a realização desse sonho, em especial minhas queridas irmãs: Rosemeire, Marlene, Gilmara, Roseli e Rita,

OFEREÇO.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por essa vitória e aos meus pais, Evaristo e Anatólia, pela sólida formação dada até minha juventude, que me proporcionou a continuidade nos estudos até este momento, meus eternos agradecimentos.

À Universidade Federal de Viçosa – UFV – MG, por intermédio dos Departamentos de Química e Fitopatologia, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Capes pela concessão da bolsa de estudo,

Ao Prof. Gulab Newandram Jham e a sua esposa Alice Jham, pela amizade, orientação, ensinamentos, incentivo e apoio constantes durante todo o curso.

Aos conselheiros, Prof. Onkar Dev Dhingra e Prof. Elson Santiago de Alvarenga pelos conselhos, ajuda e orientação para a realização deste trabalho.

Ao amigo Sérgio Tinoco, pelos conselhos, ensinamentos e amizade.

Ao técnico Eduardo Rezende, pela paciência, pelo companheirismo em todas as horas de nosso convívio.

À minha querida esposa Aline, pela dedicação, amor, fidelidade, compreensão e respeito.

Aos professores e técnicos do Departamento de Química, em especial aos professores: Paulo Gontijo, Éfrain Lázaro, Elita, Marcelo, Cláudio Lima, Célia Regina, Mayura Marques e ao técnico José Luiz (LASA-UFV) pelos bons conselhos e ensinamentos transmitidos.

Aos meus amigos incondicionais, Francisco Frederico, Douglas, Josely, Geraldo Magela, Roberto (pink), Márcio, Edson (Lontra), Fred (cachaça), Neliberto, Ezequiel (pinda) pela amizade, fidelidade e companheirismo desde o começo dessa etapa da minha vida.

Às minhas amigas Carolina e Vânia Moreira, pelas sugestões, apoio, amizade e colaboração na realização desse trabalho.

Aos meus amigos e colegas da graduação e pós-graduação em especial, Josie, Fernanda, Júlio César, Ricardo, Cristiane, Kelly, Vanessa, Vânia Carneiro, Rosimeire, Larisse, Guilherme, Vagner, Luis Gustavo, pela amizade cultivada.

A coordenação da pós-graduação em Agroquímica na pessoa do professor Luís Cláudio e aos demais professores pelos valiosos ensinamentos que contribuíram para a minha formação.

À secretária da pós-graduação, Marisa, pelo pronto atendimento, ajuda e principalmente pelo carinho, dedicação e alegria contagiante em todos os momentos.

Ao amigo Naylor Daniel, pela amizade e colaboração.

Aos funcionários da Clínica de Doenças de Plantas José Orlando, Osvaldo e Henrique pela atenção e amizade a mim dispensada durante a realização desse trabalho.

Aos estudantes pós-graduandos em fitopatologia Daniel, Davi e Maria Luiza, Henrique, pelo apoio e colaboração.

Às minhas irmãs, Rosemeire, Marlene, Gilmara, Roseli e Rita, pelo amor, carinho, apoio e incentivo.

Aos meus primos, em especial, Guilherme, Dárcio, Jaime, pela grande amizade e companheirismo.

Aos meus sogros, José Geraldo e Lúcia, pelo apoio, respeito e incentivo.

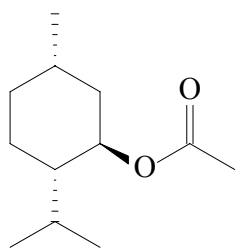
A todos os meus familiares, em especial meus cunhados, Severiano, Clóves, Marcos, Adário, Wesley, Warley, minhas avós, Júlia e Rita. pelo amor, carinho, apoio, respeito e incentivo.

Enfim, a todos que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

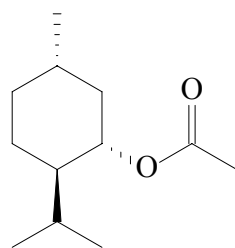
## LISTA DE ABREVIATURAS

DCM	diclorometano
OE	óleo essencial
EM	espectrômetro de massas
DIC	detector por ionização em chama
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CG-DIC	cromatografia gasosa com detector por ionização em chama
MSI	monitoramento seletivo de íons
CCD	cromatografia em camada delgada
FA	fração ativa
$R_f$	fator de retenção
$W_b$	largura da banda
IK	índice de retenção de Kováts
AF	<i>Aspergillus flavus</i>
AG	<i>Aspergillus glaucus</i>
AN	<i>Aspergillus niger</i>
AO	<i>Aspergillus ochraceus</i>
CG	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
CM	<i>Colletotrichum musae</i>
FO	<i>Fusarium oxysporum</i>
FS	<i>Fusarium semitectum</i>
BDA	batata, dextrose, ágar

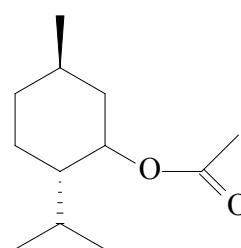
## ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NESTE ESTUDO



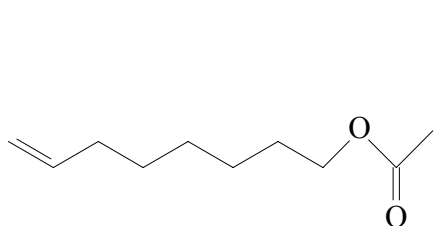
**Acetato de isomentila**



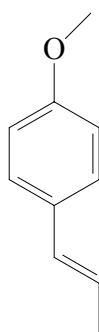
**Acetato de mentila**



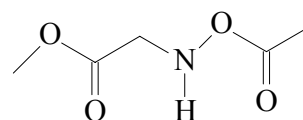
**Acetato de neomentila**



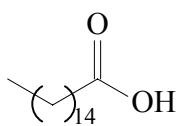
**Acetato de oct-7-en-1-ol\*\***



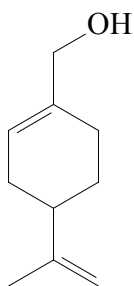
**trans-Anetola**



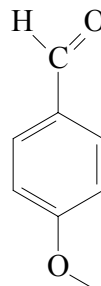
**Acetilglicinato de metila\*\***



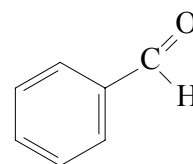
**Ácido palmítico\*\***



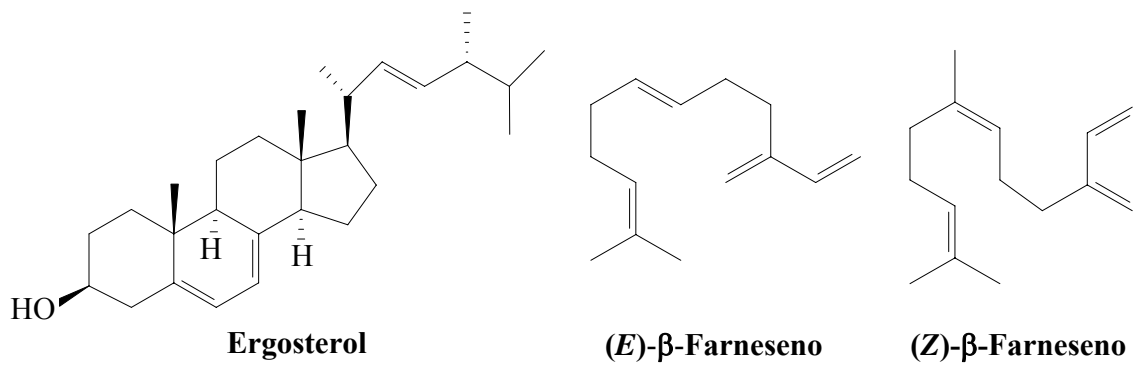
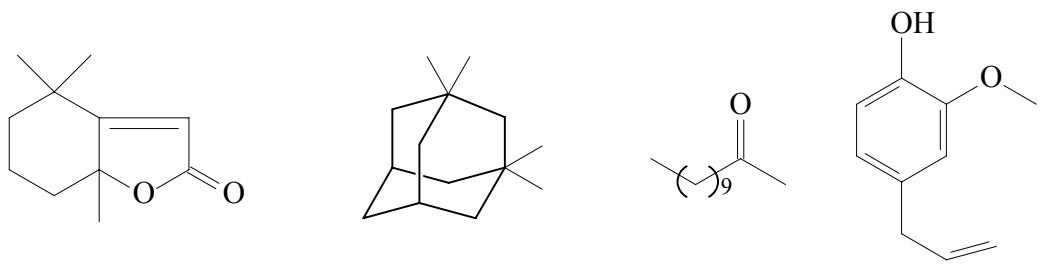
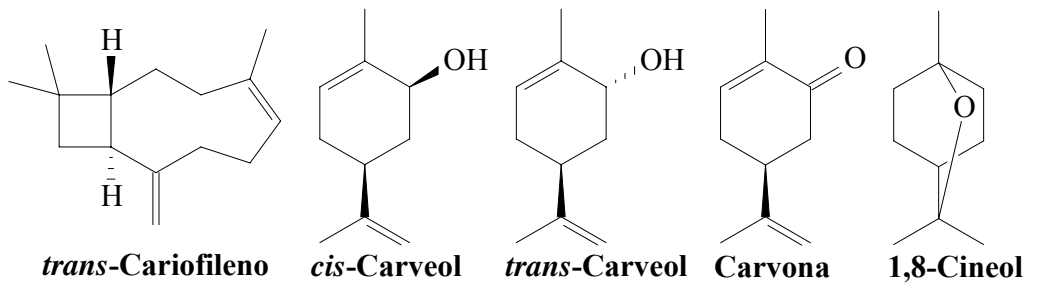
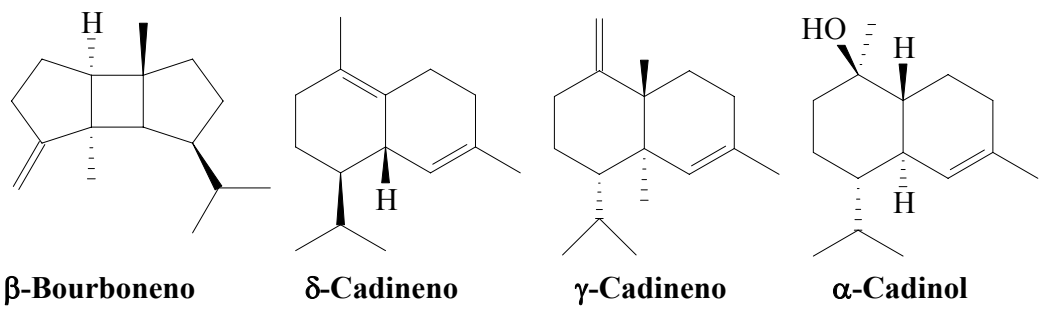
**Álcool perílico**



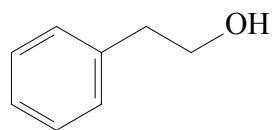
**para-Anisaldeido**



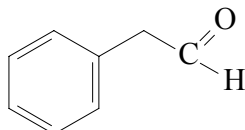
**Benzaldeido**



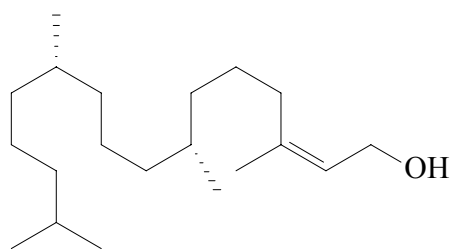




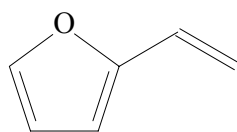
**2-Feniletan-1-ol**



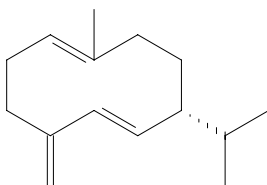
**2-Feniletanal**



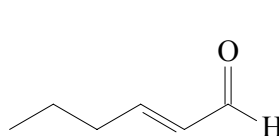
**trans-Fitol\*\***



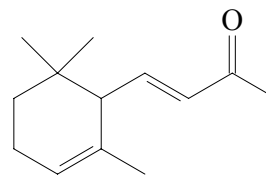
**Furfural**



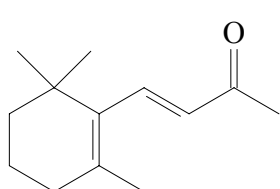
**Germacrene D**



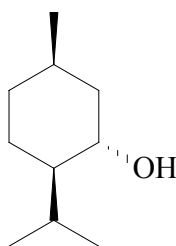
**(E)-Hex-2-nal**



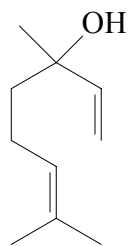
**α-(E)-Ionona**



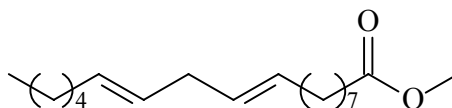
**β-(E)-Ionona**



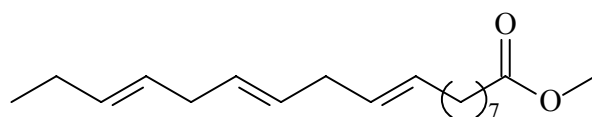
**Isomentol**



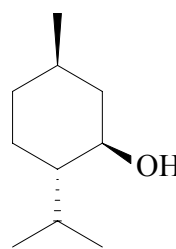
**Linalol**



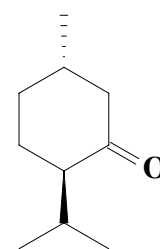
**Linoleato de metila**



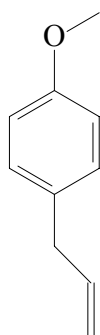
**Linolenato de metila\*\***



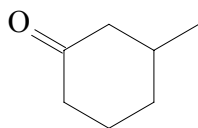
**Mentol**



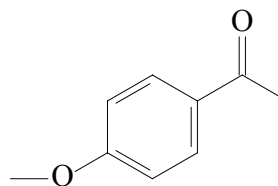
**Mentona**



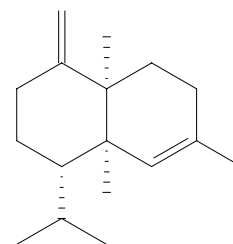
**Metilchavicol**



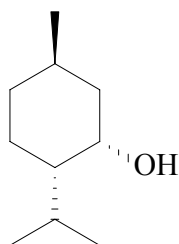
**3-Metilcicloexanona**



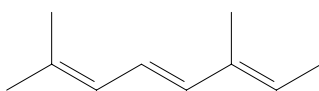
**4-Metoxiacetofenona**



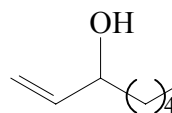
**γ-Muuroleno**



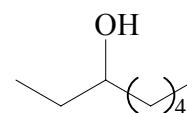
**Neomentol**



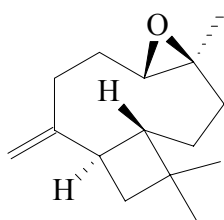
**neo-allo-Ocimeno**



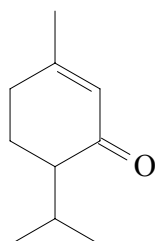
**Oct-1-en-3-ol**



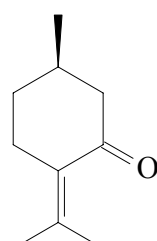
**Octan-3-ol**



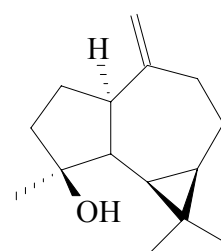
**Óxido de cariofileno**



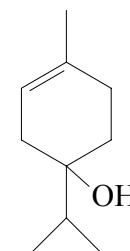
**Piperitona**



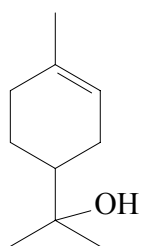
**Pulegona**



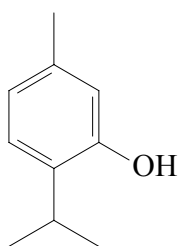
**Spatulenol**



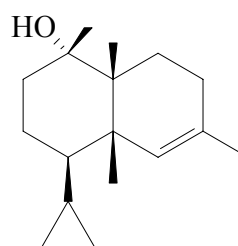
**Terpinen-4-ol**



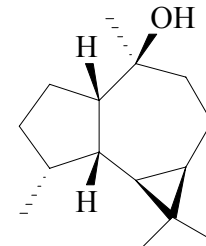
**α-Terpineol**



**Timol**



**Torreiol**



**Viridiflorol**

---

**\*\* compostos identificados somente por CG-EM**

## CONTEÚDO

RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1- INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2- ARTIGO I- <b>Avaliação da atividade antifúngica e identificação dos compostos no óleo essencial de hortelã-pimenta (<i>Mentha piperita</i> L.)</b> .....	5
Resumo .....	5
Abstract.....	6
1. Introdução .....	7
2. Materiais e Métodos .....	9
2.1. Materiais e reagentes .....	9
2.2. Extração do óleo essencial.....	9
2.3. Aquisição dos fungos.....	9
2.4. Avaliação fitopatológica.....	10
2.4.1- Potencial antifúngico do óleo essencial.....	10
2.4.2. Fracionamento do óleo essencial por cromatografia em camada delgada (CCD).....	10
2.4.3 Identificação e recuperação da fração antifúngica do óleo essencial....	11
2.4.4. Potencial antifúngico das subfrações ativas do óleo essencial.....	11
2.4.5 Análise estatística	11
2.5. Instrumentação.....	12
2.6. Identificação e quantificação dos compostos do óleo essencial e subfrações ativas.....	12

3. Resultados.....	14
4. Discussão .....	16
Anexos .....	19
<b>3- ARTIGO II- Efeito do óleo essencial de hortelã-pimenta (<i>Mentha piperita</i> L.) no controle fúngico em ração armazenada.....</b>	<b>26</b>
Resumo.....	26
Abstract.....	27
1. Introdução.....	28
2. Materiais e Métodos.....	29
2.1. Materiais e reagentes.....	29
2.2. Extração do óleo essencial.....	29
2.3. Avaliação da estabilidade do óleo essencial.....	29
2.4. Eliminação de ácaros da ração.....	31
2.5. Avaliação da umidade inicial da ração.....	31
2.6. Avaliação da contaminação fúngica da ração.....	31
2.7. Avaliação do controle fúngico pelo óleo essencial.....	31
2.8. Extração do ergosterol.....	32
2.8.1 Identificação e quantificação do ergosterol.....	32
2.9. Instrumentação.....	33
2.9.1 Análise estatística.....	33
3. Resultados.....	34
4. Discussão.....	37
Anexos.....	40
<b>4- CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>46</b>
<b>5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>47</b>

## RESUMO

FREIRE, Marcelo Moreira, MS., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2006.

**Composição e atividade antifúngica do óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.).** Orientador: Gulab Newandram Jham. Conselheiros: Onkar Dev Dhingra e Elson Santiago de Alvarenga.

O óleo essencial (OE) de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), obtido por hidrodestilação de folhas secas, foi avaliado, *in vitro*, através do ensaio “poison food” (0,1; 0,2 e 0,3%) e apresentou atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus*, *A. ochraceous*, *A. niger*, *A. glaucus*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *Colletotrichum musae* e *C. gloeosporioides*. O OE, fracionado por cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa (sílica-gel), utilizando como eluente diclorometano:hexano (2:1, v/v), apresentou 7 frações (cinco visíveis sob luz ultravioleta e duas outras quando reveladas com vanilina sulfúrica). Sua fração antifúngica (FA) foi identificada por CCD-bioautografia. A FA, com fator de retenção ( $R_f$ ) igual a 0,47 e largura da banda ( $W_b$ ) de 8,0 cm, foi fracionada em três subfrações ativas e avaliadas através do ensaio “poison food” a 0,1% e 0,2%. Os componentes do óleo essencial bruto e das subfrações ativas foram identificados por cromatografia gasosa, usando o índice de Kováts (IK) em conjunto com a espectrometria de massas, sendo identificados um total de 57 compostos. A subfração ativa 1, cujo composto principal é o mentol, se mostrou como a mais eficaz para a maioria dos fungos avaliados, seguida da subfração ativa 3, cujo composto principal é a carvona. Diante da atividade antifúngica obtida pelo OE *in vitro*, avaliou-se seu potencial antifúngico, *in vivo*, em ração para suínos à base de milho. Rações, em três umidades diferentes (13, 15 e 18%), foram tratadas com óleo essencial a 0,2% e armazenadas por 30, 60 e 90 dias. O nível de contaminação fúngica foi avaliado através da quantificação de ergosterol por CG-EM através do Monitoramento Seletivo de Íons (MSI) As concentrações de ergosterol, nas amostras quantificadas, ficaram entre 0,01 a 11,44  $\mu\text{g/g}$  de ração. O melhor controle fúngico (95,8%, à umidade de 13%) foi obtido no primeiro mês de armazenamento seguido

de 91,0%, à umidade 15%, no segundo mês. O OE, armazenado à 4°C e à 25°C, teve sua estabilidade avaliada através de cromatografia gasosa, por comparação entre as razões de áreas dos picos dos seus principais componentes (1,8-cineol, mentona, neomentol, mentol, carvona, acetato de mentila, *trans*-cariofileno e viridiflorol) e de um padrão interno (nonano). À temperatura ambiente, o componente que apresentou maior variação entre a sua quantidade inicial e após o tempo de armazenamento foi o *trans*-cariofileno. Mentona e 1,8-cineol foram os que mais degradaram quando estocados à 4°C. Como esperado, os principais componentes do óleo essencial, como um todo, mostraram-se bem mais estáveis à temperatura mais baixa (4°C).

*Palavras-chave:* Óleo essencial, *Mentha piperita* L., composição química, atividade antifúngica

## ABSTRACT

FREIRE, Marcelo Moreira, MS., Universidade Federal de Viçosa, February 2006.

**Composition and antifungal activity of pepper mint (*Mentha piperita* L.) essential oil.** Adviser: Gulab Newandram Jham. Committee Members: Onkar Dev Dhingra and Elson Santiago de Alvarenga.

Pepper mint (*Mentha piperita* L.) essential oil (EO), obtained by hydro distillation of dry leaves, was evaluated *in vitro* through a poison food assay (0.1; 0.2 and 0.3%) presented antifungal activity against *Aspergillus flavus*, *A. ochraceous*, *A. niger*, *A. glaucus*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *Colletotrichum musae* and *C. gloeosporioides*. The EO was fractioned by preparative silica gel thin layer chromatography (TLC), using hexane dichloromethane (2:1, v/v) as solvent, presenting 7 fractions (five being visible under ultraviolet light and two when revealed with vanillin-sulfuric acid). Its antifungal fraction (AF) was identified by TLC –bioautography. AF activity, with  $R_f$  value of 0.47 and band width ( $W_b$ ) of 8.0 cm, was fractioned into active three sub-fractions, evaluated through poison food assay at 0.1% and 0.2%. The components of the crude OE and of the active sub-fractions were identified by gas chromatography using the Kováts index (KI), along with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), with a total of 57 compounds being identified. Active sub-fraction 1, whose main compound was menthol, was found to be more efficient for most of the fungi evaluated, followed by active sub-fraction 3, whose main compound was carvone. In view of the antifungal activity obtained by the EO *in vitro*, its antifungal potential, *in vivo* was evaluated in corn-based swine ration. Rations were treated with essential oil at 0.2% under three humidity conditions (13, 15 and 18%) and stored for 30, 60 and 90 days. The level of fungal contamination was evaluated through ergosterol quantified by GC-MS and selective ion monitoring (SIM). The concentrations of ergosterol in the samples quantified ranged from 0.01 to 11.44  $\mu\text{g/g}$  of ration. The best fungal control (95.8%, at 13% humidity) was obtained in the first month of storage followed by 91.0%, at 15% humidity in the second month. EO stability was

assessed through gas chromatography, stored at 4°C and 25°C, by comparing the ratios of the peak areas of its main components (1,8-cineole, menthone, *neomenthol*, menthol, carvone, menthyl acetate, *trans*-caryophyllene, and viridiflorol) and internal standard (nonane). At room temperature, *trans*-caryophyllene showed the highest variation between its initial amount and after storage. Menthone and 1,8-cineole degraded the most when stored at 4°C. As expected, the main components of the essential oil, as a whole, were more stable at lower temperatures (4°C).

*Keywords:* Essential oil, *Mentha piperita* L., chemical composition, antifungal activity.



## INTRODUÇÃO GERAL

Os fungos são um dos principais agentes decompositores de matéria orgânica na natureza. Eles têm a capacidade de se desenvolver em diversos substratos, causando prejuízos econômicos volumosos. Produtos agrícolas, como grãos, sementes e frutas são severamente afetados por fungos, que podem começar a deteriorá-los no campo durante a maturação e continuar nos processos de colheita, de secagem, de transporte e de armazenamento (1). Alguns fungos são capazes de produzir substâncias tóxicas elaboradas, as micotoxinas, que podem causar intoxicações severas com efeitos cancerígenos ao homem e animais quando na ingestão de alimentos e rações contaminados (2).

Os fungos são classificados em fungos do campo e fungos do armazenamento. Os do campo contaminam os grãos durante a pré-colheita por estes requererem ambientes com umidade relativa superior a 90%. Os fungos dos gêneros: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Helminthosporium* são os mais comuns. Por outro lado, os fungos do armazenamento demandam menor quantidade de água e proliferam em maior intensidade na massa de grãos no período pós-colheita. Os fungos de armazenamento mais comuns são: *Aspergillus repens*, *A. amstelodami*, *A. ruber*, *A. restrictus*, *A. glaucus*, *A. halophilicus*, *A. candidus*, *A. ochraceus*, *A. flavus*, *A. parasiticus* e algumas espécies do gênero *Penicillium* (3). Os fungos de armazenamento *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor* são encontrados em grande número em armazéns, moinhos, silos, moegas, elevadores, equipamentos e lugares onde são armazenados, manuseados e processados produtos agrícolas (4).

O *Fusarium oxysporum* é o agente causal da doença vascular que causa murcha em plantas (5).

*Colletotrichum* é um dos gêneros de fungos patogênicos de plantas mais importante em todo o mundo, especialmente em regiões tropicais e sub tropicais. O fungo causa

doenças que levam a perdas econômicas significativas (6). Dentre essas doenças, podemos destacar a antracnose em mamão causada pelo *Colletotrichum gloeosporioides* e a antracnose e podridão-do-colo em banana causada pelo *C. musae* (7). No caso do mamão, o fungo causa uma lesão circular, deprimida, com margem marrom-clara, produzindo, na porção central, massas de esporos de cor laranja ou rosada. Com o progresso da doença, as lesões podem coalescer e causar o apodrecimento do fruto (8), causando perdas significativas a mercadistas e consumidores (9). Além disso, as lesões provocadas por *C. gloeosporioides* servem como porta de entrada para patógenos secundários e, com isso, agravam o quadro sintomatológico da doença (10). No caso da banana há formação de. Assim como no mamão, antracnose em banana leva a formação de lesões escuras e deprimidas que, com o progresso da doença, aumentam de tamanho e podem coalescer. Os sintomas em banana se manifestam sob duas formas distintas, conforme o modo de infecção: a antracnose da fruta madura tende a formar lesões circulares; a antracnose de ferimento de fruto verde causada pelo manuseio durante o transporte, forma lesões alongadas no sentido longitudinal do fruto. Os sintomas oriundos do ataque do patógeno à fruta imatura no campo (infecção latente), geralmente passam despercebidos neste estado de desenvolvimento da planta. Geralmente a polpa não é afetada, exceto a altas temperaturas ou quando o fruto torna-se muito maduro (11).

O uso de fungicidas sintéticos é um dos principais métodos de controle de doenças de plantas, porém, o uso contínuo pode promover a seleção de fungos fitopatogênicos resistentes, não controlados pelo fungicida anteriormente eficaz (12).

Devido a crescente pressão de órgãos não governamentais de caráter ecológico e de algumas instituições governamentais, especialmente nos países desenvolvidos, para evitar o uso de fungicidas sintéticos, o conseqüente aumento de espécies de patógenos resistentes e o efeito cancerígeno potencial de alguns desses produtos (13, 14), tem se desenvolvido um renovado interesse por compostos antimicrobianos naturais, particularmente aqueles derivados de plantas (15). A literatura tem registrado a eficiência de extratos obtidos de uma enorme gama de espécies botânicas em promover a inibição do desenvolvimento de vários fitopatógenos de natureza fúngica (16, 17, 18). Os óleos essenciais, por exemplo, são conhecidos por conter um coquetel natural de monoterpenos,

diterpenos e hidrocarbonetos, com uma variedade de grupos funcionais que levam a uma atividade antifúngica e antimicrobiana (19).

A hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), um híbrido natural entre *M. aquatica* e *M. spicata* que pertence à família Labiatae, é uma das espécies produtoras de terpenóides mais exploradas comercialmente(20). A hortelã-pimenta é planta de clima temperado; originária provavelmente da Inglaterra. A planta é uma erva vivaz ou perene, de ramos eretos e estolhos rastejantes, ou rizomas subterrâneos. O fuste é quadrangular, verde ou vermelho escuro a purpúreo, com altura de 40 a 80 cm, às vezes, mais de um metro, ramificado, com folhas opostas pecioladas ovais, glabras, de margem serrilhada, de cor verde escura na face superior, pálida na inferior (21). A hortelã-pimenta, é uma rica fonte de mentol, apresentando várias aplicações industriais, como em produtos de higiene bucal, flavorizantes, aromatizantes de alimentos e bebidas, em perfumaria, confeitarias e produtos farmacêuticos (22, 23).Um hectare de *M. piperita* pode render mais de 10 toneladas de matéria fresca e até o dobro disso, com rendimento de essência de 3 a 5 g/kg de matéria fresca. “Há cultivos importantes de *M. piperita* na França, Itália, Alemanha, Rússia, África Oriental, Estados Unidos e Argentina. No Brasil não se têm notícias de cultivos comerciais, mas ele deve com certeza existir em alguma região do sul do país, de clima mais fresco pela latitude ou altitude, tratando-se de planta tão conhecida e de tão alto valor” (21).



Extratos originários de *M. piperita* têm evidenciado propriedades antifúngicas, demonstrando controle para patógenos de plantas (24, 25). Seu óleo, essencial, considerado não tóxico a humanos (26), apresenta, além das propriedades antifúngicas (27-29), propriedade antiviral (30), antibacteriana (31), nematocida (32) larvicida e repelente de mosquitos (33).

A composição química do óleo essencial dessa planta tem sido relatada por alguns trabalhos. O mentol, neomentol, acetato de mentila, mentona e linalol são os monoterpenóides mais abundantes no óleo essencial de *M. piperita* (34), sendo o mentol e a mentona os principais constituintes (35, 36). Segundo Zambonelli (35), o mentol representa 47,18% da constituição do óleo, seguido pela mentona 23,65%.

Estudos mais elaborados da atividade antifúngica do óleo essencial de *M. piperita* aliado à identificação de compostos presentes são escassos na literatura. Além disso o estudo do potencial antifúngico do óleo essencial em ração armazenada não foi investigado. Sendo assim, a *M. piperita* é uma espécie que ainda tem muito a ser explorada.

Diante disso, os objetivos desse trabalho foram:

1. Avaliar a ação antifúngica, *in vitro*, do óleo essencial da espécie *M. piperita* contra *Aspergillus flavus*, *A. ochraceous*, *A. niger*, *A. glaucus*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *Colletotrichum musae* e *C. gloeosporioides*;
2. Determinar a fração antifúngica do óleo essencial;
3. Identificar os componentes do óleo essencial e os componentes da fração que apresentou atividade antifúngica.
4. Avaliar a atividade, *in vivo*, do óleo essencial em ração de porco à base de milho.
5. Avaliar a estabilidade do óleo essencial ao armazenamento em diferentes temperaturas.

## ARTIGO I

### Composição e atividade antifúngica do óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.)

Marcelo M. Freire\*, Gulab N. Jham,  
Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, 36570, Viçosa, MG, Brasil

Onkar D. Dhingra  
Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36570, Viçosa, MG, Brasil

#### Resumo

O óleo essencial (OE) de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), obtido por hidrodestilação de folhas secas, foi avaliado, *in vitro*, através do ensaio “poison food” (0,1; 0,2 e 0,3%) e apresentou atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus*, *A. ochraceous*, *A. niger*, *A. glaucus*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *Colletotrichum musae* e *C. gloeosporioides*. Dependendo do fungo, a atividade inibitória variou de 17,4% a 85,4% na concentração de 0,1%, apresentando diferença significativa para a maioria dos fungos quando essa concentração foi aumentada para 0,2%. O OE, fracionado por cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa (sílica-gel), utilizando como eluente diclorometano:hexano (2:1, v/v), apresentou 7 frações (cinco visíveis sob luz ultravioleta e duas outras quando reveladas com vanilina sulfúrica). Sua fração antifúngica (FA) foi identificada por CCD-bioautografia. A FA, com fator de retenção ( $R_f$ ) igual a 0,47 e largura da banda ( $W_b$ ) de 8,0 cm, foi fracionada em três subfrações ativas e avaliadas através do ensaio “poison food” a 0,1% e 0,2%. Os componentes do óleo essencial bruto e das subfrações ativas foram identificados por cromatografia gasosa usando o índice de Kováts (IK) em conjunto com a espectrometria de massas, sendo identificados um total de 57 compostos. A subfração ativa 1, cujo composto principal é o mentol, se mostrou como a mais eficaz para a maioria dos fungos avaliados, seguida da subfração ativa 3, cujo composto principal é a carvona.

**Palavras- chave:** *Mentha piperita* L., óleo essencial, composição química, fungos.

## Abstract

### Composition and antifungal activity of pepper mint (*Mentha piperita* L.) essential oil.

Pepper mint (*Mentha piperita* L.) essential oil (EO), obtained by hydro distillation of dry leaves, was evaluated *in vitro* through a poison food assay (0.1; 0.2 and 0.3%) presented antifungal activity against *Aspergillus flavus*, *A. ochraceous*, *A. niger*, *A. glaucus*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *Colletotrichum musae* and *C. gloeosporioides*. Depending upon the fungi, the activity inhibitory varied from 17.4 to 85.4%, at concentration of 0.1%. The EO was fractioned by preparative silica gel thin layer chromatography (TLC), using hexane dichloromethane (2:1, v/v) as solvent, presenting 7 fractions (five being visible under ultraviolet light and two when revealed with vanillin-sulfuric acid). Its antifungal fraction (AF) was identified by TLC –bioautography. AF activity, with  $R_f$  value of 0.47 and band width ( $W_b$ ) of 8.0 cm, was fractioned into active three sub-fractions, evaluated through poison food assay at 0.1% and 0.2%. The components of the crude OE and of the active sub-fractions were identified by gas chromatography using the Kováts index (KI), along with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), with a total of 57 compounds being identified. Active sub-fraction 1, whose main compound was menthol, was found to be more efficient for most of the fungi evaluated, followed by active sub-fraction 3, whose main compound was carvone.

*Keywords:* *Mentha piperita* L., essential oil, chemical composition, fungi.

## 1- Introdução

Certos fungos, causadores de danos e deterioração de produtos agrícolas, são responsáveis por consideráveis perdas para as culturas de importância econômica. Alguns são capazes de produzir substâncias tóxicas denominadas micotoxinas, que são altamente nocivas à saúde do Homem (2). As micotoxinas mais largamente encontradas em alimentos, com possível dano ao consumidor, são: aflatoxinas, esterigmatocistina, ocratoxina, zearalenona, tricotecenos, fumonisinas, patulina, rubratoxinas, esporodesminas, ácido ciclopiazônico e micotoxinas tremorgênicas. O principal grupo de fungos, de conhecida capacidade para produzir micotoxinas, inclui espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. (1)

Parte significativa da produção de frutíferas é perdida devido a doenças fúngicas pós-colheita, dentre elas podemos destacar a antracnose em mamão causada pelo *Colletotrichum gloeosporioides* e a antracnose e podridão-do-colo em banana causada pelo *C. musae* (7).

Para se evitarem os danos causados pela invasão fúngica e o uso intensivo de fungicidas químicos sintéticos, o uso de produtos naturais se constitui em uma alternativa viável e desejável em relação ao tratamento químico tradicional, principalmente em função de não deixarem resíduos tóxicos ao Homem e nos alimentos tratados (37).

Os óleos essenciais são conhecidos por conterem um coquetel natural de monoterpenos, diterpenos e hidrocarbonetos, com uma variedade de grupos funcionais que levam a uma atividade antifúngica e antimicrobiana (19).

A *Mentha piperita* L., espécie pertencente à família Labiatae, é planta de clima temperado, originária provavelmente da Inglaterra. É uma erva vivaz ou perene, de folhas opostas pecioladas ovais, glabras, de margem serrilhada, de cor verde escura na face superior, pálida na inferior e com altura de 40 a 80 cm, às vezes, mais de um metro (21). O mentol, principal componente do óleo essencial de *M. piperita*, apresenta várias aplicações industriais, como em produtos de higiene bucal, flavorizantes, aromatizantes de alimentos e bebidas, em perfumaria, confeitarias e produtos farmacêuticos (22, 23). O óleo essencial de *M. piperita* apresenta propriedade antifúngica (27-29), antiviral (30), antibacteriana (31),

nematicida (32), larvicida e repelente de mosquitos e é considerado não tóxico a humanos (26).

Devido à escassez de trabalhos que relatem a atividade antifúngica do óleo essencial de *M. piperita*, aliada à sua caracterização química, um estudo mais elaborado a fim de caracterizar os componentes com potencial antifúngico no óleo essencial de *M. piperita* se faz necessário.

Esse trabalho tem como objetivos avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *M. piperita* contra os fungos: *Aspergillus flavus*, *A. ochraceous*, *A. niger*, *A. glaucus*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *Colletotrichum musae* e *C. gloeosporioides*, identificar seus componentes e os compostos responsáveis por essa atividade.



## 2- Materiais e métodos

### 2.1. Materiais e reagentes:

As folhas de *M. piperita* (16 kg), lote MENI09/02, de origem polonesa, foram adquiridas da Santos Flora Comércio de Ervas Ltda São Paulo-SP-Brasil em março de 2005. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, sendo os solventes destilados antes de sua utilização. Foram utilizadas placas de Petri descartáveis (60 x 15 cm e 90 x 15 cm) adquiridas da J. Prolab. A sílica-gel utilizada foi adquirida da MERCK.

### 2.2 - Extração do óleo essencial:

O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação de 200 g de folhas, secas à sombra, de *M. piperita*, sendo que cada 1 L de hidrolato foi extraído por 2 vezes com 100 mL de diclorometano. A fase orgânica, seca com sulfato de magnésio anidro, foi filtrada e seu solvente evaporado em evaporador rotatório à temperatura de 35°C. A amostra obtida foi armazenada em frascos de vidro selados e guardada em geladeira a 7°C.

### 2.3- Aquisição dos fungos:

Utilizaram-se grãos e frutas contaminados por fungos: *A. flavus*, *A. ochraceous*, *A. niger*, *A. glaucus*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *C. musae* e *C. gloeosporioides*. O papel de germinação foi embebido em água autoclavada e colocado no fundo de uma placa gerbox. Grãos e fragmentos de frutas foram suavemente lavados com água e colocados em uma placa de Petri contendo álcool etílico 50%, por um minuto, sob uma câmara de fluxo. A seguir, transferiram-se os mesmos para uma segunda placa contendo água sanitária 2%, por um minuto, sendo finalmente imersos em água destilada por mais um minuto, transferidos para a placa gerbox e deixadas em incubadora, a 25°C, por 7 dias. Após esse período fez-se a identificação dos fungos e coleta de esporos, sendo estes transferidos para novas placas contendo meio de cultura BDA (batata, dextrose, ágar) e antibiótico a fim de se multiplicarem por um período de 7 dias.

## 2.4- Avaliação fitopatológica:

### 2.4.1- Potencial antifúngico do óleo essencial:

O potencial antifúngico do óleo essencial foi avaliado contra os fungos *A. flavus*, *A. ochraceous*, *A. niger*, *A. glaucus*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *C. musae* e *C. gloeosporioides*. O método utilizado baseou-se na técnica “poison food” descrita por Dhingra e Sinclair (38) e Sridhar *et al.* (19). Preparou-se o meio de cultura, BDA, cozendo-se 200 g de batata inglesa em 1 L de água, filtrando-se e recolhendo-se o filtrado, ao qual foram adicionados 20 g de dextrose e 20 g de ágar. Transferiu-se o meio assim obtido para Erlenmeyers, definindo-se o volume (100 mL) a fim de obter as concentrações desejadas, tampando-se com algodão e autoclavando por 20 minutos a 120 °C. O óleo foi emulsificado com tween 20 (0,1% v/v) e incorporado ao meio de cultura juntamente com o antibiótico (sulfato de estreptomicina) de modo que ficasse com concentrações finais de 0,1; 0,2 e 0,3% (v/v). Após a solidificação do meio de cultura, adicionou-se os esporos dos fungos avaliados, ao centro de cada placa de Petri, sob a forma de um círculo de 0,5mm de diâmetro. Prepararam-se placas controle contendo o meio de cultura, tween 20, o antibiótico e esporos do fungo, visando observar o desenvolvimento deste em condições normais. Todos os testes foram feitos em três repetições para cada concentração e fungo, sendo as placas vedadas e mantidas à temperatura de 25°C por um período de 7 dias. A cada 24h o crescimento micelial dos fungos, determinado pelo diâmetro da colônia, era medido. A atividade antifúngica foi expressa em termos da inibição do crescimento micelial e calculada segundo a fórmula:

$$\frac{dc - dt}{dc} \times 100$$

Onde, dc = medida do diâmetro da colônia do fungo controle

dt = medida do diâmetro da colônia do fungo com tratamento

### 2.4.2- Fracionamento do óleo essencial por cromatografia em camada delgada (CCD):

O fracionamento do óleo essencial foi obtido aplicando-se 200 mg do óleo por placa de cromatografia em camada preparativa (20 x 20 cm, com fase estacionária de 1 mm de sílica-gel 60GF<sub>254</sub>) utilizando-se como fase móvel diclorometano e hexano (2:1 v/v).

As frações foram visualizadas sob luz ultravioleta com comprimento de onda de 254 nm ou através de revelação com solução de vanilina sulfúrica.

#### 2.4.3- Identificação e recuperação da fração antifúngica do óleo essencial

A fração ativa do óleo essencial foi determinada baseando-se na técnica de bioautografia em camada delgada descrita por Sridhar *et al* (19). Foram aplicadas 75 mg de óleo essencial em uma placa preparativa (20 x 5 cm). A placa foi desenvolvida com diclorometano:hexano (2:1 v/v), revelada sob luz UV para identificação de suas frações e depois coberta por uma fina camada de meio de cultura acrescido de esporos do fungo (*A. flavus*) e antibiótico (sulfato de estreptomicina). Esta foi colocada em uma bandeja esterilizada e umedecida com água autoclavada, coberta com filme de PVC transparente e incubadas a 25°C por um período de 7 dias para o crescimento do fungo. A região onde o fungo não se desenvolveu, foi atribuída à fração ativa do óleo essencial. Essa fração, identificada em outras placas por comparação entre fator de retenção ( $R_f$ ) e largura da banda ( $W_b$ ), foi recuperada sob a forma de três subfrações ativas (somente duas visíveis sob luz ultravioleta) raspando-se cada uma delas da fase estacionária, extraindo-se com diclorometano, sob agitação magnética (3h), filtrando-se a vácuo em funil de vidro sinterizado e eliminando o solvente em evaporador rotatório.

#### 2.4.4- Potencial antifúngico das subfrações ativas do óleo essencial

O potencial antifúngico das subfrações ativas do óleo essencial foi avaliado nas concentrações de 0,1 e 0,2% utilizando-se a mesma metodologia descrita para óleo (item 2.4.1).

#### 2.4.5- Análise estatística:

Os dados da inibição do crescimento micelial feito em três repetições foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, usando-se o programa SAEG - Sistema de Análises Estatísticas em Genética (39).

## 2.5- Instrumentação

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás (Shimadzu, CG-17A) com detector por ionização em chama (DIC), auto-injetor (Shimadzu, AOC-17); coluna de sílica fundida revestida com fase estacionária DB-5, (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm de espessura do filme, J & W Scientific), temperatura inicial 60°C, isotérmico por 1 min, aumento de 3°C/min até atingir 240°C, permanecendo isotérmico por 9 min; nitrogênio foi utilizado como gás de arraste, fluxo de 1,33 mL/min; temperatura do injetor 220°C; temperatura do detector 240°C; modo de injeção Split, na razão 1:20. Utilizou-se, também, um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM), (Shimadzu, QP 5000); injetor automático (Shimadzu, AOC-17); coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm de espessura do filme, Supelco) revestida com fase estacionária Equity<sup>TM</sup>-5, temperatura inicial 60°C, isotérmico por 1 min, aumento de 3°C/min até atingir 240°C, permanecendo isotérmico por 9 min; hélio ultrapuro foi usado como gás de arraste, fluxo de 1 mL/min; temperatura do injetor 220°C; temperatura da interface 280°C; modo de injeção Split 1:20; modo de ionização impacto de elétrons (70 eV); faixa de massa ( $m/z$ ) 40 – 350.

## 2.6 - Identificação e quantificação dos compostos do óleo essencial e subfrações ativas:

As amostras de óleo essencial e das subfrações ativas de *M. piperita* foram preparadas à concentração de 10 mg/mL em diclorometano e 1 µL foi injetado tanto no aparelho de CG-DIC quanto no de CG-EM. Seus componentes foram identificados através do índice de Kováts (IK), calculados por uma interpolação relativa dos tempos de retenção de uma série de n-alcenos (de 7 a 26 carbonos) em comparação com dados da literatura (37) e com a identificação feita através da biblioteca do CG-EM (Wiley 7).

O índice de retenção de Kováts expressa o número de átomos de carbono, multiplicado por 100, de um alceno hipotético de cadeia normal que teria um tempo de retenção ajustado idêntico ao do pico de interesse quando analisado sob condições idênticas.

Utilizou-se a equação 1 para o cálculo do índice de retenção de Kováts (IK).

$$IK = 100 Z + \frac{100 [(\log t'_R X) - (\log t'_R Z)]}{(\log t'_R Z + 1) - (\log t'_R Z)} \quad (\text{equação 1})$$

Onde:

X, o composto de interesse;

$t'_R X$ , o tempo de retenção ajustado de X;

Z, o número de átomos de carbono do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente anterior ao tempo de retenção de X;

$t'_R Z$ , o tempo de retenção ajustado de Z;

$t'_R Z + 1$ , o tempo de retenção ajustado do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente posterior ao tempo de retenção de X;

### 3. Resultados

O óleo essencial de *M. piperita* foi obtido a partir de folhas secas em rendimento de 0,6% e foram identificados e quantificados cerca de 96% do total de compostos nele presentes (tabela 1). O cromatograma do óleo essencial é mostrado na figura 1. A fração ativa (figura 2), determinada por CCD-bioautografia, apresentou fator de retenção ( $R_f$ ) igual 0,47 e largura da banda ( $W_b$ ) de 8,0 cm. A placa de cromatografia em camada preparativa apresentava quando revelada sob luz ultravioleta 5 frações e ao ser revelada com vanilina sulfúrica apresentou mais duas frações. A fração ativa que foi determinada por CCD-bioautografia era composta por três das sete frações reveladas, sendo essa isolada sob a forma de três subfrações ativas cujos fatores de retenção e largura da banda são, subfração ativa 1 ( $R_f = 0,43$  e  $W_b = 6,5$ ), subfração ativa 2 ( $R_f = 0,60$  e  $W_b = 0,5$ ) e subfração ativa 3 ( $R_f = 0,68$  e  $W_b = 1$ ). Foram feitas 63 placas cromatográficas, sendo o rendimento da subfração ativa 1: 31,75%; da subfração ativa 2: 6,15% e da subfração ativa 3: 5,15%.

Somente as subfrações ativas 2 e 3, do óleo bruto, foram visíveis sob luz ultravioleta, sendo isoladas antes da subfração ativa 1 que não era visível sob luz ultravioleta e foi isolada baseando-se no seu fator de retenção e largura da banda. Na subfração ativa 1, foram identificados 4 compostos: neomentol (1,52%), mentol (94,27%),  $\alpha$ -terpineol (2,15%), menta furanona (2,06%); na subfração ativa 2, 13 compostos: 1,8-cineol (1,57%), neomentol (14,15%), mentol (41,87%), terpinene-4-ol (5,84%), isomentol (1,76%), acetato de oct-7-en-1-ol (2,32%), pulegona (2,59%), carvona (2,28%), piperitona (6,11%), menta furanona (1,27%), spatulenol (4,5%), viridiflorol (14,40%), torreiol (1,34%) e na subfração ativa 3, 10 compostos: 1,8-cineol (5,62%), mentona (10,62%), neomentol (21,48%), pulegona (5,49%), carvona (33,93%), benzaldeído (1,64%), timol (3,49%), eugenol (2,23%), 1,3-dimetil adamantano (3,42%), óxido de cariofileno (12,18%). Os cromatogramas das três subfrações ativas são apresentados nas figuras 3, 4 e 5 respectivamente.

O óleo essencial de *M. piperita* apresentou atividade antifúngica sobre os oito fungos avaliados nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,3% (Figura 6). A concentração de 0,1% o crescimento micelial de todos os fungos foi inibido apenas parcialmente, sendo a porcentagem de inibição ao quinto dia de avaliação de 78,3% para o *A. ochraceous*, 70,8% para o *A. flavus*, 60,6% para o *A. glaucus*, 44,1% para o *A. niger*, 82,0% para o *C. musae*, 17,4% para o *C. gloeosporioides*, 77,4% para o *F. semitectum*, 85,4% para o *F. oxysporum*. A análise da variância seguida pelo teste de médias de Tukey a 5% não

revelou diferença significativa na inibição do crescimento micelial, nesse ensaio, para os fungos *F. oxysporum* e *C. musae* e nem entre o *A. ochraceous* e *F. semitectum*. A 0,2% observou-se que não houve inibição total do crescimento micelial somente do fungo *A. glaucus*, visto que, a análise de variância seguida pelo teste de médias de Tukey a 5% não revelou diferença significativa entre a inibição do crescimento micelial do *C. musae* e os que foram totalmente inibidos. A 0,3% todos tiveram inibição total do crescimento micelial, exceto o *A. glaucus* que apresentou inibição de 92,4%.

Todos os fungos avaliados mostraram-se sensíveis à presença das subfrações ativas no meio de cultura (figuras 7 e 8). No sexto dia de avaliação foi observado que a subfração ativa 1 a 0,1% era mais ativa para os fungos *A. flavus*, *A. glaucus*, *A. ochraceous*, *F. oxysporum*, *C. musae* e *C. gloeosporioides*, a 2 mais efetiva para o *A. niger* e a 3 para *F. semitectum*. Na concentração de 0,2% a subfração ativa 3 passou a ser mais efetiva que a 1 para o *A. flavus* e mais efetiva que a 2 para o *A. glaucus* e *A. ochraceous* e a subfração ativa 2 nessa concentração passou a ser mais efetiva que a 3 para o *C. gloeosporioides* e *C. musae* quando comparado à concentração de 0,1%.

#### 4- Discussão:

A maioria dos componentes do óleo essencial de *M. piperita* foram identificados através do índice de Kováts (IK) e dados da espectrometria de massas, havendo uma boa concordância com os dados da literatura (40). Alguns compostos, porém, só puderam ser identificados através do índice de similaridade do espectro de massas do composto com dados da biblioteca do aparelho, visto que, não havia dados na literatura disponível. O índice de Kováts calculado para alguns compostos diferiu da literatura, mas, esta diferença não foi superior a dez unidades e esta variação pode ser justificada pelas diferentes concentrações de cada composto na amostra, erros cromatográficos etc.

Os componentes do óleo essencial, aqui identificados, em sua maior parte, eram monoterpenos, sendo que o principal deles é o mentol (44,92%), seguido da mentona (6,02%), neomentol (5,19%), carvona (4,09%) e acetato de mentila (3,29%) e em menores quantidades outros monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos. Esse resultado quando comparado a outros da literatura é semelhante para alguns compostos. Segundo dados da literatura a concentração de alguns desses compostos em óleo essencial está entre 30-81,1% para o mentol, 2,9-5,9% para o neomentol, 5,8-33% para a mentona, 0,1- 5,5% para o acetato de mentila (26, 27, 33, 35) e 0,6-23,42% para a carvona (16, 30). Martins *et al.* (41), identificaram 40 compostos no óleo essencial das partes aéreas de *M. piperita*, porém, não detectaram o mentol, sendo o composto principal o acetato de linalila (72%). Duarte *et al.* (16), identificaram somente 10 compostos, sendo que dentre estes não foi detectada a presença de mentol, sendo o composto principal o linalol (51%). Logo, como visto, há uma grande variação da composição do óleo essencial dessa espécie. Essas variações podem ser atribuídas às diferentes origens geográficas e idades das plantas. Em estudos realizados com extratos e óleos de folhas de *M. piperita* mostram que a quantidade dos principais terpenos dessa espécie pode variar com a idade e local de origem da planta (42, 43). Assim, torna-se necessária a identificação e quantificação dos seus componentes antes de qualquer ensaio biológico.

As propriedades antifúngicas do óleo essencial de *M. piperita* têm sido divulgadas em alguns trabalhos (25, 29, 30, 33, 44-48). Neste presente estudo, ele apresentou atividade antifúngica sobre todos os fungos avaliados, sendo esta inibição aumentada com o aumento da concentração. Kritzinger *et al.* (25), relatou que esse óleo inibiu o crescimento dos fungos de armazenamento *A. flavus*, *A. niger*, *F. oxysporum*, *F. equiseti* e *Penicillium chrysogenum*, sendo que somente o *A. niger*, a 0,2%, não teve inibição total. Belmont e Carvajal (17), verificaram que o óleo essencial da *M. piperita*



mostrou total inibição do *A. flavus* em milho. Entre os fungos do gênero *Aspergillus*, o *A. niger* foi o que apresentou maior resistência ao óleo essencial na concentração de 0,1%. Dentre os *Colletotrichum*, o agente causal da podridão de frutos em mamoeiro, *C. gloeosporioides*, apresentou a maior resistência ao óleo na concentração de 0,1%, porém, foi o mais sensível ao aumento da concentração de 0,1 para 0,2%. O *C. gloeosporioides* foi avaliado por Ribeiro *et al.* (37), utilizando extratos aquoso de *M. piperita* que promoveu a inibição do crescimento do micélio de 18,3% na concentração de 0,1% e de 23,94% na concentração de 0,2%. Zambonelli *et al.* (34), realizaram testes *in vitro* com óleo essencial da *M. piperita* contra *Rhizoctonia solani* Kühn, *Pythium ultimum* Trow var. *ultimum*, *F. solani* e *C. lindemuthianum*, esse inibiu completamente o crescimento de todos os fungos a 0,16%. Segundo Baruah *et al.* (16) o óleo de *M. piperita* exibiu atividade antifúngica contra *F. moniliforme* e a atividade antifúngica dele aumenta com a concentração. Neste trabalho as espécies do gênero *Fusarium* se mostraram bastantes sensíveis ao óleo na concentração de 0,1%, tendo inibição total do crescimento micelial acima de 0,2%.

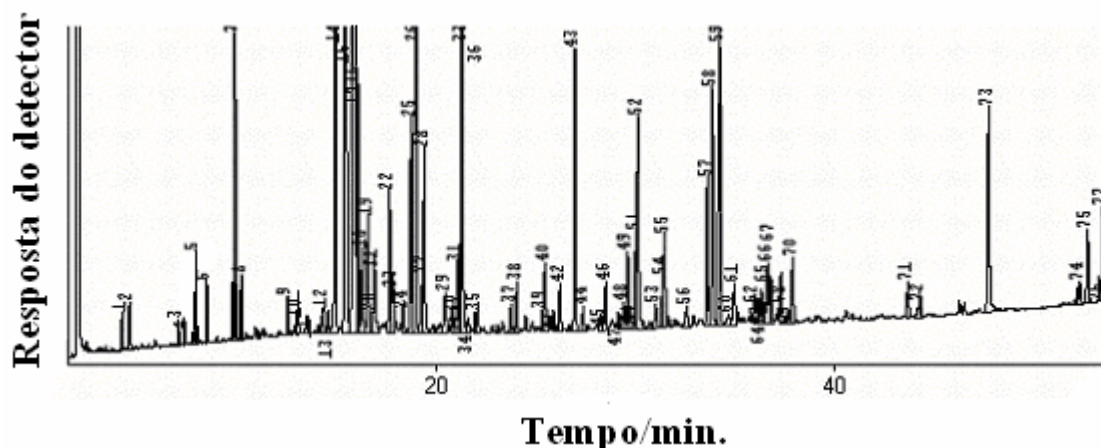
O mentol era o principal componente da fração 1. A atividade da subfração ativa 1 é atribuída ao mentol e essa subfração foi a que teve melhor atividade a 0,1% para maioria dos fungos avaliados. Segundo Edris e Farrag (27), que avaliaram o efeito do mentol e mentona contra *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.), *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb. exFr.) Vuill e *Mucor* sp. (Fisher), o mentol se mostrou como componente responsável pelas propriedades antifúngicas e seu efeito era aumentado na presença de mentona, sendo que esta sozinha não apresenta essa propriedade. A subfração ativa 3 diferente das outras duas, não apresenta mentol na sua constituição, porém, apresenta como composto principal a carvona, esta relatada por Sridhar *et al.*(19) como composto com alta atividade antifúngica, além disso, as subfrações ativas 2 e 3 apresentavam o neomentol, composto com atividade antifúngica descrita por Niridy (33), que avaliou a atividade do mentol, neomentol, acetato de mentila, mentona e linalol contra o *C. gloeosporioides*, todos esses inibiram o do crescimento micelial deste fungo. Além do composto citado para a subfração ativa 3, ela ainda apresenta o timol e o eugenol que segundo Belmont e Carvajal (17), apresenta atividade contra o *A. flavus*, sendo o timol o mais ativo. Isto também, foi verificado por Luna *et al.*(18), que comprovou que o timol era o mais efetivo para inibição do crescimento micelial do *F. moniliforme*, ainda segundo ele as concentrações mínimas inibitórias para as espécies de *Aspergillus*, estão entre os valores de 0,01-0,04% para o timol, 0,0125-0,03% para o eugenol e de 0,06% para o mentol sobre o *A. parasiticus* Assim, as propriedades antifúngicas comprovadas

dessas 2 últimas subfrações ativas não podem ser atribuídas a um único composto presente em cada uma delas, mas sim ao possível efeito aditivo ou sinérgico entre estes compostos.

Nesse presente trabalho, pôde-se confirmar o potencial antifúngico *in vitro* do óleo essencial de *M. piperita*, identificar seus compostos e os da sua fração ativa.

Faz-se necessário ainda, um estudo da eficiência da aplicação do óleo essencial de *M. piperita* no campo contra os fungos que foram avaliados, dos efeitos tóxicos ao homem e ao ambiente, DL<sub>50</sub>, interações negativas, etc. para que se possa recomendar o seu uso para agricultores em escala comercial. Além disso, a atividade biológica do óleo essencial bruto e fracionado contra outras pragas como nematóides, insetos, dentre outras deve ser investigada, visto que, poucos trabalhos relatam essas atividades. Desta maneira saberemos se a utilização do óleo de *M. piperita* ou de alguns de seus componentes é uma alternativa viável no controle de pragas.

ANEXOS:



**Figura 1:** Cromatograma típico obtido ao analisar o óleo essencial bruto de *M. piperita* L. por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama. Coluna de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25  $\mu$ m de espessura do filme, J & W Scientific) revestida com fase estacionária DB-5. Programação de temperatura: inicial 60°C (1 min), aumento de 3°C/min até atingir 240°C (9 min), fluxo do gás de arraste (N<sub>2</sub>) 1,33 mL/min; temperatura do injetor 220°C; temperatura do detector 240°C; modo de injeção Split 1:20. Amostras a 10 mg/mL em diclorometano. Os picos identificados são apresentados na tabela 1.

**Tabela 1:** Identificação dos compostos no óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita L.*) por comparação entre os índice de Kováts (IK) e dados dos espectros de massas dos compostos com dados da biblioteca do CG-EM (Wiley 7).

Nº do pico	Índice de retenção de Kováts (IK)*	Composto	Porcentagem relativa					
			Neste estudo	Literatura <sup>#</sup>				
				1	2	3	4	5
1	830	Furfural	0,16	-	-	-	-	-
2	854	(E)-Hex-2-enal	0,26	-	-	-	-	-
3	952	3-Metilciclohexanona	0,12	-	-	-	-	-
4	961	Benzaldeído	0,13	-	-	-	-	-
5	978	Oct-1-en-3-ol	0,58	<0,05	-	-	-	-
6	993	Octan-3-ol	0,29	-	-	-	-	10,09
7	1033	1,8-Cineol	2,1	0,3	-	6,76	9,23	-
8	1043	2-Feniletanal	0,31	-	-	-	-	-
9	1098	Linalol	0,21	12,3	0,3	-	-	51,03
10	1110	2-Feniletan-1-ol	0,24	-	-	-	-	-
12	1142	neo-allo- Ocimeno	0,19	-	-	-	-	-
14	1154	Mentona	6,02	-	11,7	25,36	23,65	-
15	1165	Neomentol	5,19	-	5,9	0,30	-	-
16	1173	Mentol	44,42	-	48,7	42,96	47,18	-
17	1177	Terpinen-4-ol	1,39	0,05	-	-	-	8,0
18	1182	Isomentol	0,70	-	-	-	-	-
19	1188	α-Terpineol	1,06	1,0	-	0,38	-	1,31
21	1195	Metilchavicol	0,61	-	-	-	-	-
22	-	Acetato de oct-7-en-1-ol **	0,90	-	-	-	-	-
23	1217	trans-Carveol	0,51	-	-	-	-	-
24	1229	cis-Carveol	0,23	-	-	-	-	-
25	1237	Pulegona	1,54	-	-	-	0,06	-
26	1242	Carvona	4,09	-	-	-	-	23,42
27	1252	para-Anisaldeído	0,54	-	-	-	-	-
28	1252	Piperitona	1,16	-	-	0,72	-	-
29	1275	Acetato de neomentila	0,41	-	-	-	-	-
30	1283	trans-Anetola	0,21	-	-	-	-	-
31	1295	Álcool perílico	0,54	-	-	-	-	-
32	1290	Timol	0,46	-	-	-	-	-
33	1294	Acetato de mentila	3,29	5,5	-	3,89	0,1	-
36	1306	Acetato de isomentila	0,17	-	-	-	-	-
37	1348	4-Metoxiacetofenona	0,16	-	-	-	-	-
38	1356	Eugenol	0,31	-	-	-	-	-
40	1384	β-Bourboneno	0,65	0,1	-	-	-	0,18
42	1426	α-(E)-Ionona	0,40	-	-	-	-	-
43	1418	trans-Cariofileno	2,01	2,0	-	-	-	2,31

44	1443	(Z)- $\beta$ -Farneseno	0,16	-	-	-	-	-
46	1458	(E)- $\beta$ -Farneseno	0,42	<0,05	-	-	-	-
48	1477	$\gamma$ -Muuroleno	0,19	<0,05	-	-	-	-
49	1480	Germacreno D	0,54	1,1	-	1,91	-	0,44
50	1485	$\beta$ -(E)-Ionona	0,18	-	-	-	-	-
51	-	1,3-Dimetiladamantano**	0,64	-	-	-	-	-
52	-	Menta furanona**	1,56	-	-	-	-	-
53	1513	$\gamma$ -Cadineno	0,21	-	-	-	-	-
54	1524	$\delta$ -Cadineno	0,37	-	-	-	-	-
55	-	Diidroactinidiolida**	0,64	-	-	-	-	-
57	1576	Spatulenol	1,06	-	-	-	-	-
58	1581	Óxido de cariofileno	1,72	0,1	-	-	-	-
59	1590	Viridiflorol	2,38	1,2	-	-	-	-
63	1645	Torreiol	0,24	-	-	-	-	-
66	1653	$\alpha$ -Cadinol	0,56	-	-	-	-	-
71	-	Dodecan-2-ona**	0,25	-	-	-	-	-
72	-	Acetilglicinato de metila**	0,23	-	-	-	-	-
73	-	Ácido palmítico**	1,80	-	-	-	-	-
74	2092	Linoleato de metila	0,16	-	-	-	-	-
75	-	Linolenato de metila**	0,56	-	-	-	-	-
77	-	<i>trans</i> -Fitol**	0,81	-	-	-	-	-
		outros	3,76	76,2	33,4	17,72	19,78	3,22

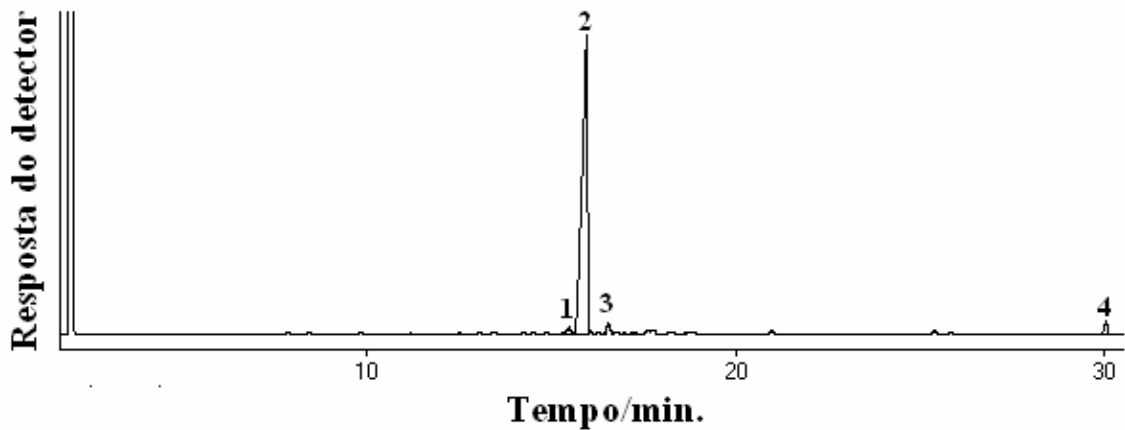
\* Adams (40).

\*\* compostos identificados somente pela biblioteca do aparelho de CG-EM (Wiley7)

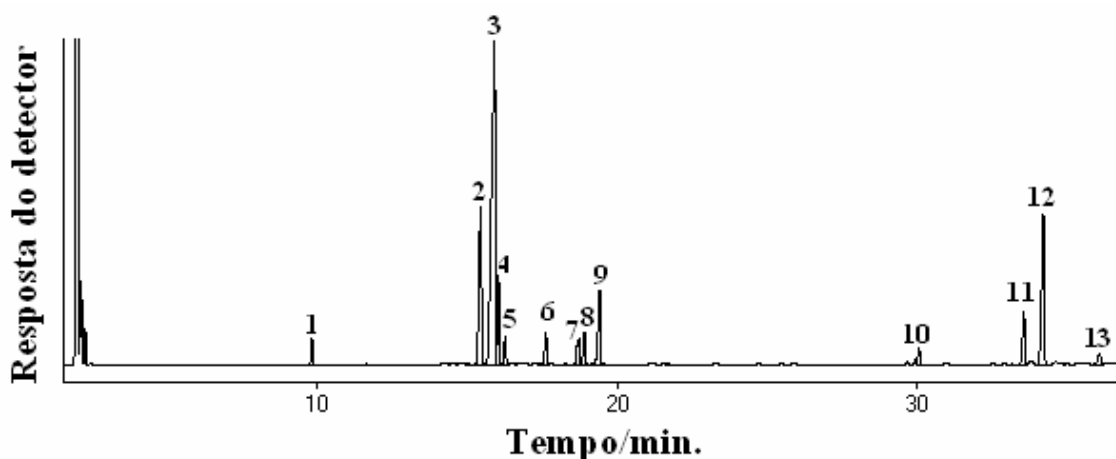
# 1- Martins *et al.*, 2004 (41); 2- Niridy *et al.*, 1998 (33); 3- Maffei and Mucciarelli, 2003 (20); 4- Zambonelli *et al.*, 1996 (34); 5- Duarte *et al.*, 2005 (16).



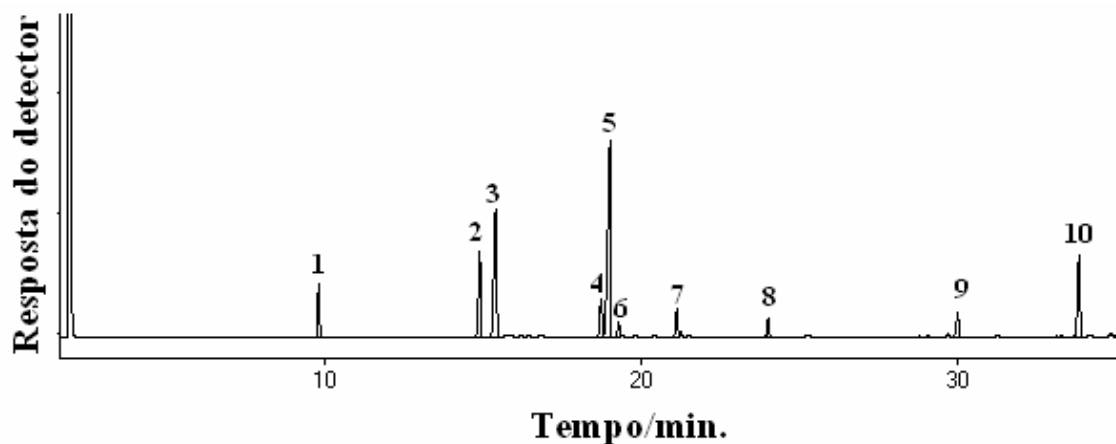
**Figura 2:** Foto do ensaio CCD-bioautografia, mostrando a fração ativa, obtida 7 dias após aplicação de meio de cultura contendo grande número de esporos de *A. flavus* (AF) sobre uma placa de cromatografia em camada delgada preparativa 20 x 5 cm [60 mg de óleo essencial, 1 mm de sílica-gel 60G F<sub>254</sub> e diclorometano:hexano (2:1 v/v) como eluente].



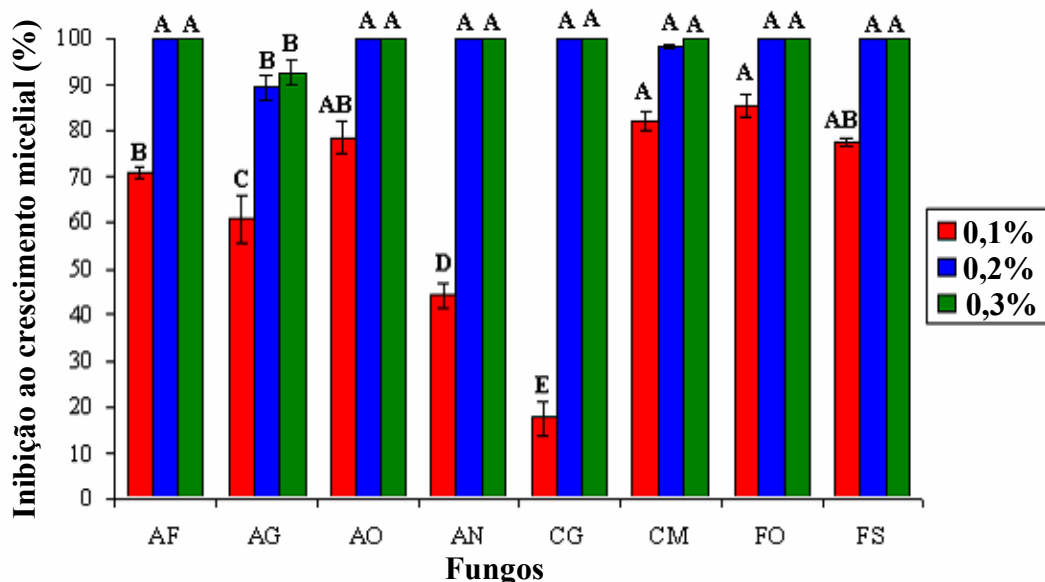
**Figura 3:** Cromatograma típico da subfração ativa 1 (fração não visível sob luz ultravioleta) obtido por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama. Coluna de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm de espessura do filme, J & W Scientific) revestida com fase estacionária DB-5. Programação de temperatura: inicial 60°C (1 min), aumento de 3°C/min até atingir 240°C (9 min), fluxo do gás de arraste (N<sub>2</sub>) 1,33 mL/min; temperatura do injetor 220°C; temperatura do detector 240°C; modo de injeção Split 1:20. Amostras a 10 mg/mL em diclorometano. Os picos identificados são: 1. neomentol, 2. mentol, 3. α-terpineol, 4. menta furanona.



**Figura 4** Cromatograma típico da subfração ativa 2 (visível sob luz ultravioleta), obtido por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama. Coluna de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm de espessura do filme, J & W Scientific) revestida com fase estacionária DB-5. Programação de temperatura: inicial 60°C (1 min), aumento de 3°C/min até atingir 240°C (9 min), fluxo do gás de arraste (N<sub>2</sub>) 1,33 mL/min; temperatura do injetor 220°C; temperatura do detector 240°C; modo de injeção Split 1:20. Os picos identificados são: 1. 1,8-cineol, 2. neomentol, 3. mentol, 4. terpinen-4-ol, 5. isomentol, 6. acetato de oct-7-en-1-ol, 7. pulegona, 8. carvona, 9. piperitona, 10. menta furanona, 11. spatulenol, 12. viridiflorol, 13. torreiol.

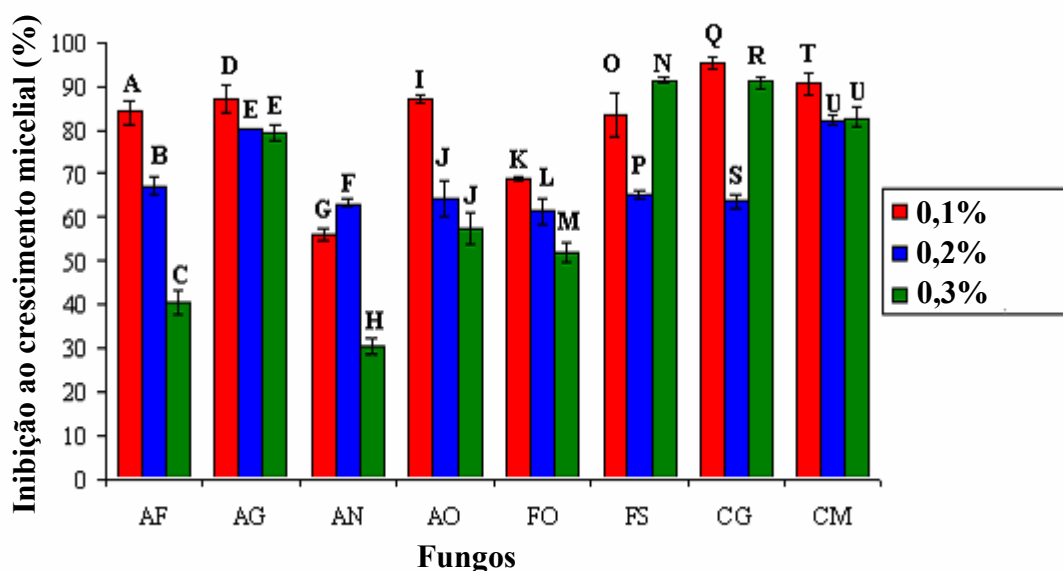


**Figura 5:** Cromatograma típico da subfração ativa 3 (visível sob luz ultravioleta), a 10 mg/mL, obtido por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama. Coluna de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm de espessura do filme, J & W Scientific) revestida com fase estacionária DB-5. Programação de temperatura: inicial 60°C (1 min), aumento de 3°C/min até atingir 240°C (9 min), fluxo do gás de arraste (N<sub>2</sub>) 1,33 mL/min; temperatura do injetor 220°C; temperatura do detector 240°C; modo de injeção Split 1:20. Os picos identificados são: 1. 1,8-cineol, 2. mentona, 3. neomentol, 4. pulegona, 5. carvona, 6. *para*-anisaldeido, 7. timol, 8. eugenol, 9. 1,3-dimetil adamantano, 10. óxido de cariofileno.



**Figura 6** - Porcentagem de inibição do crescimento micelial apresentada por *A. flavus* (AF), *A. glaucus* (AG), *A. niger* (AN), *A. ochraceus* (AO), *F. oxysporum* (FO), *F. semitectum* (FS), *C. gloeosporioides* (CG) e *C. musae* (CM) no quinto dia de avaliação do ensaio “poison food”, submetidos ao óleo essencial de *Mentha piperita* L. a 0,1; 0,2 e 0,3% no meio de cultura.

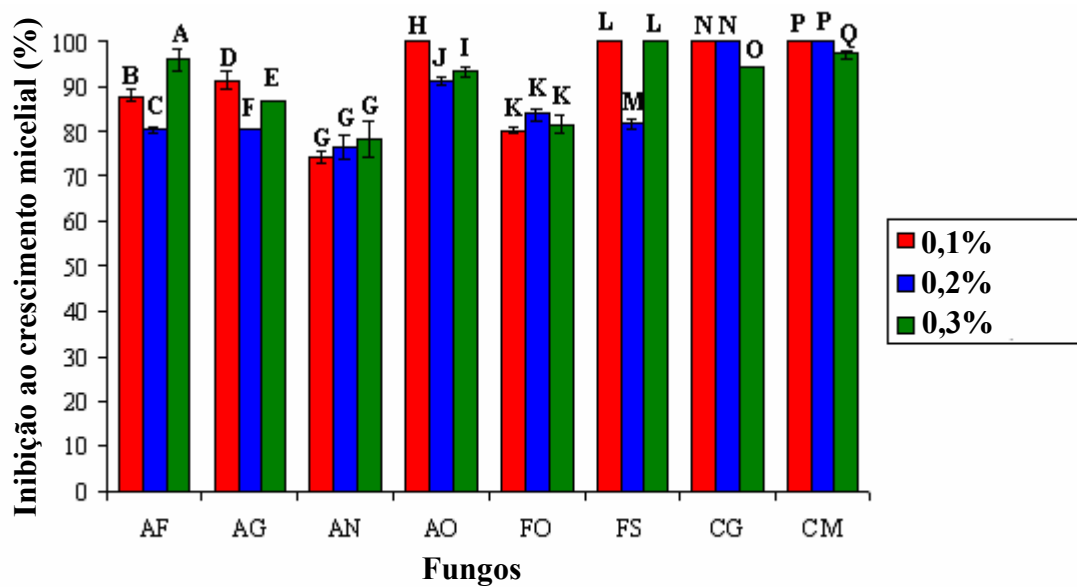
\*Os dados apresentados nas colunas, de mesma cor, seguidos por diferentes letras são significativamente diferentes pelo método de análise de Variância de Tukey a 5%. As barras (I) representam o desvio padrão.



**Figura 7:** Inibição do crescimento micelial dos fungos apresentada por *A. flavus* (AF), *A. glaucus* (AG), *A. niger* (AN), *A. ochraceus* (AO), *F. oxysporum* (FO), *F. semitectum* (FS), *C. gloeosporioides* (CG) e *C. musae* (CM) no sexto dia de avaliação do ensaio “poison food”, submetidos às subfrações ativas 1, 2 e 3 da fração ativa do óleo essencial de *Mentha piperita* L. a 0,1% no meio de cultura.

\*Os dados apresentados nas colunas, para o mesmo fungo, seguidos por diferentes letras são significativamente diferentes pelo método de análise de Variância de Tukey a 5%. As barras (I) representam o desvio padrão.





**Figura 8:** Inibição do crescimento micelial dos fungos apresentada por *A. flavus* (AF), *A. glaucus* (AG), *A. niger* (AN), *A. ochraceus* (AO), *F. oxysporum* (FO), *F. semitectum* (FS), *C. gloeosporioides* (CG) e *C. musae* (CM) no sexto dia de avaliação do ensaio “poison food”, submetidos às subfrações ativas 1, 2 e 3 da fração ativa do óleo essencial de *Mentha piperita* L. a 0,2% no meio de cultura.

\*Os dados apresentados nas colunas, para o mesmo fungo, seguidos por diferentes letras são significativamente diferentes pelo método de análise de Variância de Tukey a 5%. As barras (I) representam o desvio padrão.

## ARTIGO II

### **Efeito do óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.) no controle fúngico em ração armazenada**

Marcelo M. Freire\*, Gulab N. Jham,  
Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, 36570, Viçosa, MG, Brasil

Onkar D. Dhingra  
Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36570, Viçosa, MG, Brasil

#### **Resumo**

Testes foram conduzidos para avaliar a estabilidade do óleo essencial (OE) de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.) a diferentes temperaturas (4°C e 25°C) e determinar *in vivo* a proteção oferecida pelo OE contra os fungos de armazenamento presentes em ração à base de milho para suínos. A ração, avaliada em três umidades (13, 15 e 18%) e tempos (30, 60 e 90 dias) diferentes, foi tratada com óleo essencial na concentração de 0,2%. A medida do ergosterol, composto específico das membranas de fungos, foi utilizada para determinar o nível de controle fúngico obtido pelo óleo essencial. Nesse trabalho, utilizou-se a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), operada no modo de Monitoramento Seletivo de Íons (MSI) para essa quantificação. O melhor controle fúngico, 95,8%, foi conseguido no primeiro mês de armazenamento na umidade de 13%. No último mês o melhor controle fúngico foi 75,3% na umidade de 13%. As concentrações de ergosterol, nas amostras quantificadas, ficaram entre 0,01 e 11,44 µg/g de ração. O OE, teve sua estabilidade avaliada, através de cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (CG-DIC), por comparação entre as razões de áreas dos picos dos seus principais componentes (1,8-cineol, mentona, neomentol, mentol, carvona, acetato de mentila, *trans*-cariofileno e viridiflorol) e de um padrão interno (nonano). O *trans*-cariofileno, à temperatura ambiente, foi o que revelou a maior diferença entre as quantidades inicial e final nas amostras de óleo. Os compostos do óleo armazenado em geladeira que mais se degradaram foram a mentona e o 1,8-cineol. Como esperado, os principais componentes do óleo essencial, como um todo, mostraram-se bem mais estáveis à temperatura mais baixa (4°C).

*Palavras-chave:* Óleo essencial, *Mentha piperita* L., ergosterol, fungos, CG-EM

## Abstract

### Effect of (*Mentha piperita* L.) essential oil on fungal control of stored ration

Tests were performed to evaluate the stability of pepper mint (*Mentha piperita* L.) essential oil (EO) at 4°C and 25°C and determine *in vivo* the protection offered by the EO against storage fungi found in corn-based swine ration. The ration was treated with 0.2% EO and evaluated at three humidity (13, 15, and 18%) levels and times (30, 60, and 90 days). Rations were treated with essential oil at 0.2% under three humidity conditions (13, 15 and 18%) and stored for 30, 60 and 90 days. The level of fungal contamination was evaluated through ergosterol quantified by GC-MS and selective ion monitoring (SIM). The concentrations of ergosterol in the samples quantified ranged from 0.01 to 11.44 µg/g of ration. The best fungal control (95.8%, at 13% humidity) was obtained in the first month of storage followed by 91.0%, at 15% humidity in the second month. EO stability was assessed through gas chromatography, stored at 4°C and 25°C, by comparing the ratios of the peak areas of its main components (1,8-cineole, menthone, *neomenthol*, menthol, carvone, menthyl acetate, *trans*-caryophyllene, and viridiflorol) and internal pattern (nonane). At room temperature, *trans*-caryophyllene showed the highest variation between its initial amount and after storage. Menthone and 1,8-cineole degraded the most when stored at 4°C. As expected, the main components of the essential oil, as a whole, were more stable at lower temperatures (4°C).

**Keywords:** Essential oil, *Mentha piperita* L., ergosterol, fungi, GC-MS

## 1- Introdução:

Em climas tropicais e subtropicais, o desenvolvimento fúngico em cereais, é favorecido por excelentes condições de umidade e temperatura (49). Fungos de armazenamento, como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor* são encontrados em grande número em armazéns, moinhos, silos, moegas, elevadores, equipamentos e lugares onde são armazenados, manuseados e processados produtos agrícolas (4).

Devido aos danos causados ao homem e ao meio ambiente pelos defensivos químicos (8) e as restrições impostas por regulamento a indústrias e agências de alimentos sobre o uso de alguns aditivos sintéticos em alimentos (15), os produtos naturais originários de plantas vêm sendo utilizados para a preservação de alimentos em vários países, sendo que, dentre as plantas com propriedades antifúngicas, as especiarias são as que apresentam melhor atividade, mas, como óleo essencial, somente algumas delas foram testadas (17).

A óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), um híbrido natural entre *M. aquatica* e *M. spicata* que pertence à família de Labitae (50), apresenta atividade contra o *Aspergillus flavus* em sementes de milho (17). Estudos *in vitro* mostraram uma boa atividade antifúngica contra os fungos *A. flavus*, *A. ochraceous*, *A. niger*, *A. glaucus*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *Colletotrichum musae* e *C. gloeosporioides* (51).

A maioria dos trabalhos relacionados com a *M. piperita* relata a sua atividade antifúngica *in vitro*, ensaios biológicos para avaliar a real atividade do óleo essencial *in vivo* são escassos. No caso dos ensaios com ração, não há nada disponível na literatura.

Uma das formas de se avaliar a invasão fúngica em alimentos infestados é através da medida do teor de ergosterol. Esta análise é um dos melhores indicadores da biomassa fúngica quando comparado aos outros métodos disponíveis (52), apresentando alta sensibilidade e especificidade (53). A determinação do ergosterol na biomassa fúngica pode ser realizada por espectrofotometria ultravioleta e infravermelha, associadas a métodos cromatográficos como camada delgada, líquida de alto desempenho e gasosa (54).

O objetivo desse trabalho foi determinar, *in vivo*, através da quantificação de ergosterol, a proteção oferecida pelo óleo essencial de *M. piperita* contra os fungos presentes em ração para suínos armazenada e avaliar a estabilidade desse óleo a diferentes temperaturas (4°C e 25°C) de armazenamento.

## 2- Materiais e métodos

### 2.1. Materiais e reagentes

As folhas de *M. piperita* (16 kg), lote MENI09/02, de origem polonesa, foram adquiridas da Santos Flora Comércio de Ervas Ltda São Paulo-SP-Brasil em março de 2005. A ração foi adquirida no comércio de produtos agrícolas da cidade de Viçosa-Mg. Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico.

### 2.2 - Extração do óleo essencial:

O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação de 200 g de folhas, secas à sombra, de *M. piperita*, sendo que cada 1 L de hidrolato foi extraído por 2 vezes com 100 mL de diclorometano. A fase orgânica, seca com sulfato de magnésio anidro, foi filtrada e seu solvente evaporado em evaporador rotatório à temperatura de 35°C.

### 2.3 - Avaliação da estabilidade do óleo essencial

Para avaliar a estabilidade do óleo essencial, a diferentes temperaturas, utilizou-se da adição de um padrão interno com o objetivo de comparar a área dos principais picos do óleo essencial com a área desse padrão, antes e após o armazenamento. Para isso, 1 mL de uma solução a 5 mg/mL do óleo essencial recém extraído em diclorometano foi analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), utilizando-se 50 µL de uma solução de nonano em diclorometano a 10 mg/mL como padrão interno. Quantidades iguais de 500 mg desse óleo foram adicionados a 2 ampolas de 1 mL, sendo estas congeladas em nitrogênio líquido e vedadas a fogo de maçarico. Uma delas foi guardada em geladeira a 4° C e a outra à temperatura ambiente (25° C), sendo ambas protegidas contra a luz.

Selecionaram-se os 8 principais compostos do óleo essencial, para fazer a comparação entre áreas: 1,8-cineol, mentona, neomentol, mentol, carvona, acetato de mentila, *trans*-cariofileno e viridiflorol. Esses principais componentes do óleo essencial, foram identificados através do índice de Kováts (IK), calculados por uma interpolação relativa dos tempos de retenção de uma série de n-alcenos (de 7 a 26 carbonos) em comparação com dados da literatura (40) e dos espectros de massas dos compostos com dados da biblioteca do CG-EM (Wiley 7).

O índice de retenção de Kováts expressa o número de átomos de carbono, multiplicado por 100, de um alceno hipotético de cadeia normal que teria um tempo de retenção ajustado idêntico ao do pico de interesse quando analisado sob condições idênticas.

Utilizou-se a equação 1 para o cálculo do índice de retenção de Kováts (IK).

$$IK = 100 Z + \frac{100 [(\log t'_R X) - (\log t'_R Z)]}{(\log t'_R Z + 1) - (\log t'_R Z)} \quad (\text{equação 1})$$

Onde:

X, o composto de interesse;

$t'_R X$ , o tempo de retenção ajustado de X;

Z, o número de átomos de carbono do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente anterior ao tempo de retenção de X;

$t'_R Z$ , o tempo de retenção ajustado de Z;

$t'_R Z + 1$ , o tempo de retenção ajustado do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente posterior ao tempo de retenção de X;

Após 90 dias foram preparadas soluções a 5 mg/mL do óleo essencial em diclorometano de cada uma das amostras armazenadas. e a 1 mL de cada acrescentados 50 µL de uma solução de nonano em diclorometano a 10 mg/mL como padrão interno para serem analisadas no CG-EM.

A avaliação da estabilidade foi feita pela comparação entre as razões de área de cada um dos principais picos dos componentes do óleo essencial, antes e depois de armazenado, pela área do pico do padrão interno (C9). A porcentagem de degradação foi calculada pela fórmula seguinte:

$$\frac{[RA_{CA}] - [RA_{CD}]}{[RA_{CA}]} \times 100$$

Onde,  $[RA_{CA}]$  = Razão de área do componente antes do armazenamento

$[RA_{CD}]$  = Razão de área do componente após o armazenamento à temperatura de 4°C ou 25°C.

#### 2.4- - Eliminação de ácaros da ração

A ração foi congelada por 96 horas para eliminação de possíveis ácaros.

#### 2.5 - Avaliação da umidade inicial da ração:

Seis amostras da ração foram pesadas e colocadas em uma estufa a 105°C por 24h. Deixou-se esfriar em dessecador e quando atingiram a temperatura ambiente foram repesadas e tiveram suas umidades calculadas. A média desses valores foi utilizada como a umidade inicial da ração.

#### 2.6 Avaliação da contaminação fúngica da ração:

A análise da contaminação fúngica da ração foi realizada em laboratório, pela inoculação de uma suspensão aquosa de esporos presentes na ração em meio de cultura e pela medida de ergosterol na ração através de análise por CG-EM. Os fungos presentes na ração não foram identificados.

#### 2.7 - Avaliação do controle fúngico pelo óleo essencial:

A avaliação foi feita com óleo na concentração de 0,2%. O controle fúngico em ração para suínos à base de milho foi avaliado mês a mês nas umidades de 13%, 15% e 18%, durante três meses consecutivos. A ração, cuja umidade inicial era de 13%, foi levada às outras umidades de avaliação acrescentando-se água. Para a umidade normal utilizou-se metanol como meio para que o óleo fosse pulverizado, nas outras duas umidades o óleo foi emulsificado com tween 20 (0,2% v/v) na própria água utilizada para atingir-se a umidade desejada.

O óleo (1,3 g) foi aplicado homogeneamente a 650 g de ração utilizando-se uma misturadora e pistola automática. Todos os testes foram feitos em 3 amostragens para cada mês de análise e em três repetições para cada umidade, sendo 50 g de cada amostra colocados em frascos de vidro, vedados com um filme de PVC transparente e mantidos em incubadora à temperatura de 25°C. A cada mês era avaliada, indiretamente, a massa fúngica na ração através da quantificação de ergosterol por CG-EM. Com base nesta avaliação, calculou-se a atividade antifúngica em termos de porcentagem de redução do ergosterol acumulado segundo a fórmula:

$$\frac{[Ec]-[Et]}{[Ec]} \times 100$$

Onde, [Ec] = Concentração de ergosterol na amostra de ração controle

[Et] = Concentração de ergosterol na amostra de ração tratada

## 2.8 - Extração do ergosterol:

Em frascos de vidro foram colocados 25 g da ração de cada amostra, foram adicionados 85 mL de metanol, aquecidos em banho-maria na temperatura de 50°C, sob agitação, durante 2 minutos. A mistura foi filtrada em papel Whatman nº1 e a ração foi ressuspensa em 85 mL de metanol, aquecida e filtrada novamente. Os filtrados foram reunidos e saponificados com 25 g de NaOH e 85 mL de etanol sob fervura em banho-maria a 75°C durante 40 minutos, após atingir a temperatura ambiente, acrescentou-se 165 mL de água a mistura que foi transferida para um funil de separação de 1L, sendo em seguida extraída com hexano por duas vezes (2 x 85 mL). Os extratos foram combinados e concentrados até aproximadamente 2 mL em evaporador rotatório à temperatura de 35°C, transferidos para frascos de 4 mL, levados à secura utilizando-se fluxo de N<sub>2</sub>. As amostras foram ressuspensas em 3 mL de diclorometano, homogeneizadas e centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. Um volume de 1 mL foi retirado para análise.

### 2.8.1 - Identificação e quantificação do ergosterol :

O ergosterol foi identificado nas amostras através de seu tempo de retenção comparado com autêntico padrão, sendo 1 µL da amostra injetado no CG-EM e monitorado através do modo MSI. A quantificação foi realizada através de padronização externa, baseado em uma curva linear de calibração ( $r^2 = 0,9992$ ) de 7 pontos (figura 1), preparada com padrão de ergosterol recristalizado com pureza de 89% em concentrações entre 0,99 e 100 ng/µL.

Foram feitos três brancos para cada mês de avaliação utilizando-se o mesmo método e reagentes utilizados para a extração do ergosterol da ração.



## 2.9 - Instrumentação

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás (Shimadzu, CG- 17A) com detector de ionização em chama (DIC), auto-injetor (Shimadzu, AOC-17); coluna de sílica fundida revestida com fase estacionária DB-5, (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm de espessura do filme, J & W Scientific), temperatura inicial 60°C, isotérmico por 1 min, aumento de 3°C/min até atingir 240°C, permanecendo isotérmico por 9 min. Nitrogênio foi utilizado como gás de arraste, fluxo de 1,33 mL/min; temperatura do injetor 220°C; temperatura do detector 240°C; modo de injeção Split, na razão 1:20. Utilizou-se, também, um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM), (Shimadzu, QP 5000); injetor automático (Shimadzu, AOC-17); coluna capilar de sílica fundida revestida com fase estacionária Equity<sup>TM</sup>-5 (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm de espessura do filme, Supelco), temperatura inicial 150°C, aumento de 15°C/min até atingir 280°C, permanecendo isotérmico por 22 min.; hélio ultrapuro foi usado como gás de arraste, fluxo de 1,5 mL/min; temperatura do injetor 260°C; temperatura da interface 280°C; modo de injeção *Splitless*; modo de ionização impacto de elétrons (70 eV); operando no modo de Monitoramento Seletivo de Íons (MSI), cujos íons monitorados foram  $m/z$  55,  $m/z$  69,  $m/z$  143.

### 2.9.1- Análise estatística:

Na análise de dados foi utilizada a técnica estatística de análise fatorial (3 x 3 x 2), num delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, realizadas com auxílio do Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG), versão 5.0 (39). Os dados foram submetidos à análise de variância e as concentrações de ergosterol, obtidas em cada tratamento, foram comparadas por meio do teste de Tukey a 5% de probabilidade. A análise de variância foi seguida da escolha das curvas que melhor representassem a dependência da concentração de ergosterol com o tempo, para as três porcentagens de umidades utilizadas e da aplicação do teste F nos coeficientes da equação para detectar significância em nível de 5%.

### 3. Resultados

O óleo essencial de *M. piperita* foi obtido a partir de folhas secas em rendimento de 0,6%. Os principais componentes do óleo essencial, aqui identificados, eram monoterpenos, sendo que o principal deles é o mentol (42,61%), seguido da mentona (6,31%), neomentol (5,34%), carvona (4,37%) e acetato de mentila (3,32%) e em menores quantidades outros monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos em proporções semelhantes a determinações anteriores (51).

A comparação entre as razões de áreas dos principais componentes do óleo essencial (área relativa do pico componente/área relativa do pico do nonano) indicou o mentol como o composto mais estável, quando armazenado à temperatura de 25°C, em relação aos outros componentes analisados. Quando comparado o óleo armazenado a 4°C com o armazenado a 25°C, o neomentol se mostrou como o mais estável a essas diferentes temperaturas. A carvona foi o composto mais sensível a essas diferenças de temperatura, mostrando-se muito mais estável a temperatura de 4°C. O *trans*-cariofileno, à temperatura ambiente, foi o que revelou a maior diferença entre a sua quantidade inicial e a final na amostra. Os compostos do óleo armazenado em geladeira que mais se degradaram foram a mentona e o 1,8-cineol. A tabela 1 mostra a porcentagem de degradação de cada um desses compostos, assim como, as razões de áreas, entre os principais compostos analisados e o padrão interno, obtidas antes e após o armazenamento do óleo essencial de *M. piperita* sob diferentes temperaturas (4°C e à temperatura ambiente, 25°C). Os principais componentes do óleo essencial, como um todo, mostraram-se bem mais estáveis à temperatura mais baixa (4°C). A figura 2 mostra a porcentagem dos compostos no óleo essencial de *M. piperita* antes e depois de armazenados.

A figura 3 mostra o espectro de massas do ergosterol onde se observa os principais picos,  $m/z$  41,  $m/z$  43,  $m/z$  55,  $m/z$  69,  $m/z$  81,  $m/z$  91,  $m/z$  105,  $m/z$  119,  $m/z$  143,  $m/z$  157. Dentre esses foram selecionados três para serem monitorados pelo aparelho no modo de monitoramento seletivo de íons (MSI),  $m/z$  55,  $m/z$  69,  $m/z$  143. Apesar de existirem outros picos com intensidades maiores que o  $m/z$  143, eram picos comuns ou que coincidiam com picos de outros compostos existentes na ração e que saíam muito próximo aos picos do composto monitorado (ergosterol). A figura 4 mostra um cromatograma típico de uma amostra monitorada no modo MSI, onde os íons monitorados aparecem destacados.

A ração apresentou umidade de 13% e já se encontrava contaminada com fungos. As concentrações de ergosterol, nas amostras quantificadas, ficaram entre 0,01 e 11,44 µg/g de ração, conforme mostra a tabela 2.

Um experimento realizado *in vitro*, mostrou que o óleo essencial de *M. piperita*, apresentou boa atividade antifúngica contra os fungos *A. flavus*, *A. ochraceous*, *A. niger*, *A. glaucus*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *C. musae* e *C. gloeosporioides*, sendo que na concentração de 0,2%, ao quinto dia de avaliação, ele só não inibiu totalmente o crescimento micelial do *A. glaucus* (51). Baseando-se o controle fúngico em ração pela redução do teor de ergosterol, o óleo essencial de *M. piperita*, na concentração de 0,2%, apresentou uma boa atividade sobre os fungos presentes na ração, conforme mostra a figura 5. Na umidade inicial da ração, 13%, o controle foi de 95,8% no primeiro mês, caindo para 83,9% no segundo mês e para 75,3% no último mês de análise. Na umidade de 15% o controle foi de 86,4% no primeiro mês, 91,0% no segundo mês e 48,6% no último. Na umidade de 18% o controle foi de 86,1% no primeiro mês, 46,7% no segundo mês e 51,0% no último mês de análise.

A análise estatística dos dados revelou pelo teste F que há significância em nível de 5% entre os fatores: concentração de ergosterol, umidade e tempo. A aplicação do teste de médias de Tukey a 5% levou em consideração a interação entre os três fatores citados anteriormente, cujos resultados são apresentados na tabela 2, na qual as letras maiúsculas se referem as médias de concentração de ergosterol nas amostras tratadas e sem tratamento (testemunha) pelo óleo essencial numa mesma umidade e período de tempo e as letras minúsculas as médias de concentração de ergosterol para as amostras tratadas e para as sem tratamento nas diferentes umidades e num mesmo período de tempo. As médias das concentrações de ergosterol em µg/g de ração, tabela 2, revelaram, com base no teste de médias de Tukey a 5%, que não houve diferença significativa, no primeiro mês de análise, entre as concentrações de ergosterol nas amostras de ração tratada e sem tratamento pelo óleo essencial de *M. piperita* nas umidades de 13 e 15%, havendo diferença significativa apenas na umidade de 18%. No segundo e terceiro meses de análise, não houve diferença significativa entre as concentrações de ergosterol nas amostras de ração tratada e sem tratamento apenas para o tratamento a 13% de umidade. Nessa mesma análise, a comparação entre as médias, em um mesmo período e em diferentes umidades, revelou para a ração sem tratamento (testemunha) que no primeiro mês de análise não há diferença significativa entre a concentração de ergosterol nas umidades de 13 e 15%, havendo diferença entres essas

duas e a concentração de ergosterol na umidade de 18%. No segundo e terceiro meses de análise houve diferença significativa entre as concentrações médias de ergosterol para as três umidades. O teste de Tukey a 5% revelou que, no primeiro mês, não há diferença entre as médias de concentração de ergosterol para a ração tratada pelo óleo essencial. No segundo mês não houve diferença significativa entre a concentração de ergosterol nas umidades 13 e 15%, havendo diferença significativa entre a concentração de ergosterol na umidade de 18% e essas duas outras umidades. No terceiro mês houve diferença significativa entre as concentrações de ergosterol nas três umidades. A tabela 3, mostra a equação ajustada para cálculo da concentração de ergosterol em função do tempo para a ração tratada e sem tratamento (testemunha) nas umidades de 13, 15 e 18%.

#### 4- Discussão:

A freqüente mudança na composição química do óleo essencial leva a mudanças drásticas no valor comercial do óleo essencial, causando conseqüente perda de renda (26). Estudos realizados com extratos e óleos de folhas de *M. piperita* mostram que a quantidade dos principais terpenos dessa espécie pode variar com a idade e local de origem da planta (42, 43), mas nada relatam sobre a estabilidade desses compostos.

Este presente estudo, além de avaliar a estabilidade do óleo essencial e o seu potencial fungicida *in vivo*, serve também para ratificar a utilidade da quantificação do ergosterol como um método para determinar o crescimento fúngico em alimentos.

Segundo dados da literatura a concentração dos compostos em óleo essencial de *M. piperita* está entre 30-81,1% para o mentol, 2,9-5,9% para o neomentol, 5,8-33% para a mentona, 0,1- 5,5% para o acetato de mentila (26, 27, 33, 35) e 0,60-23,42% para a carvona (16, 30). Martins *et al.* (41) não detectaram o mentol no óleo essencial das partes aéreas de *M. piperita*, detectando como composto principal o acetato de linalila (72%). Duarte *et al.* (16) também não detectaram a presença de mentol em sua análise, detectando como composto principal o linalol (51%).

Neste estudo, para a avaliação da estabilidade dos principais componentes do óleo essencial de *M. piperita*, foi necessária a adição de uma quantidade definida de um padrão interno às amostras analisadas para que pudesse ser feita a comparação entre as razões de áreas (área relativa do pico do componente/área relativa do pico nonano) obtidas antes e após o armazenamento, visto que, a concentração do mesmo seria constante. Se houvesse variação nessa concentração devido a erros experimentais, essa seria bem semelhante para todas as amostras, pois foi utilizada a mesma metodologia. Então, variações nas áreas dos picos durante análise, devidas à sensibilidade do aparelho, seriam repassadas às áreas de todos os picos da mesma forma. Logo, a adição do padrão foi de fundamental importância para essa comparação. De acordo com a tabela 1, os óleos armazenados em geladeira e à temperatura ambiente, quando comparados com o óleo essencial antes do armazenamento, mostram uma diminuição nas razões de áreas entre seus componentes e o nonano quanto maior a temperatura de armazenamento, o que revela que houve uma degradação dos compostos avaliados.

Pela análise do teor de ergosterol nas amostras, pelo modo MSI, pode-se comprovar que a ração tratada com óleo essencial na concentração de 0,2% teve um menor nível de desenvolvimento fúngico. Os níveis de ergosterol obtidos pela análise no aparelho de CG-EM, mostraram que as amostras de ração, naturalmente

contaminadas, que sofreram tratamento pelo óleo essencial, eram menos vulneráveis ao ataque fúngico nas umidades mais baixas (13 e 15%). O aumento da umidade favoreceu o crescimento fúngico nas rações avaliadas, porém, não teve efeito significativo no potencial de inibição do óleo no primeiro mês, que se manteve elevado. No penúltimo mês de avaliação houve uma significativa diferença entre os tratamentos das umidades 13 e 15% em relação a umidade de 18%. A ração, ao ser adquirida, apresentava nível médio de ergosterol de  $5,0 \times 10^{-2}$  µg/g de ração e quando aumentada a umidade para 18% e incubada durante três meses, apresentou nível médio de ergosterol de 11,44 µg/g de ração.

A baixa concentração de ergosterol na ração tratada pelo óleo essencial mostra a real atividade desse na inibição do crescimento fúngico e conforme Seitz & Pomeranz (55), grãos de milho saudáveis possuem geralmente concentrações de ergosterol inferiores a 3 µg/g. A concentração de ergosterol encontrada no último mês de análise só foi superior a esse valor na ração tratada que possuía umidade de 18%.

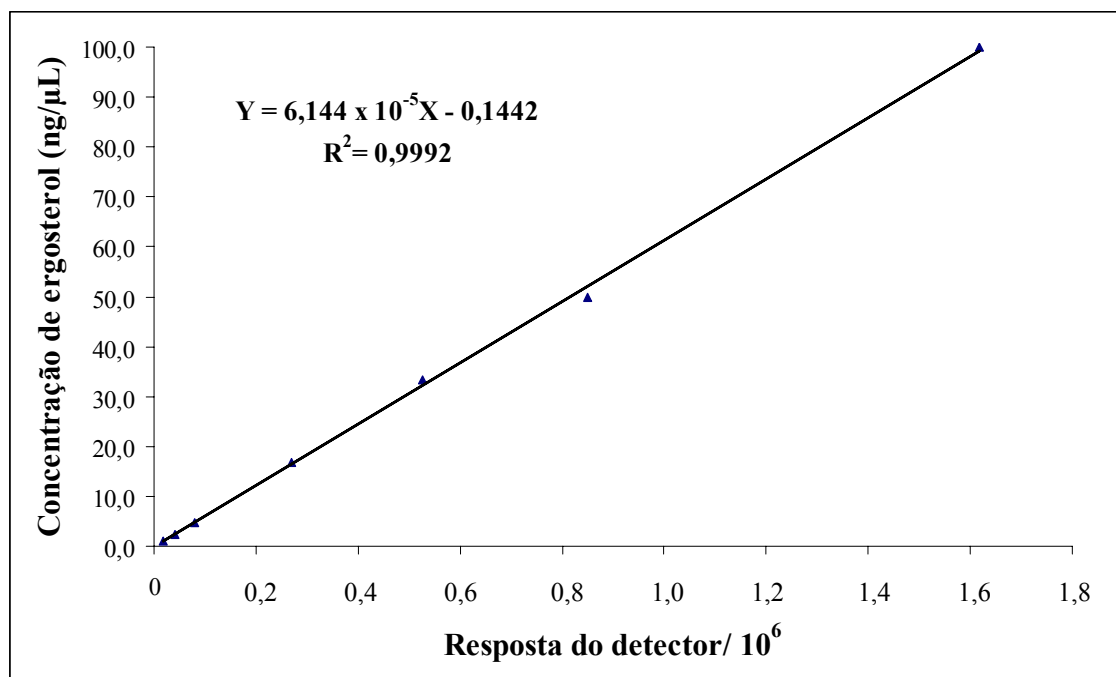
O óleo essencial de *M. piperita* apresentou atividade de 100% para a maioria dos fungos *in vitro*, a 0,2% (51), porém, houve uma diminuição nessa atividade *in vivo*. Alguns autores discutem que a menor atividade dos óleos essenciais *in vivo* pode ser devida às interações dos compostos ativos presentes, conhecidos por serem lipofílicos, com os componentes dos alimentos, como proteínas e lipídeos, o que faz com que esta atividade diminua (17, 56).

Neste experimento, a diminuição dessa atividade é atribuída não só a essas interações, mas, também, a diminuição dos compostos ativos do óleo essencial com o passar do tempo. A tabela 2 mostra que com o aumento do tempo de armazenamento o teor de ergosterol nas amostras tratadas pelo óleo essencial de *M. piperita* foi aumentado em relação à testemunha. Esse aumento indica uma diminuição gradativa da eficiência do óleo essencial em controlar o crescimento fúngico. Essa diminuição de atividade pode estar relacionada a diminuição da mentona que segundo Edris e Farrag (27), aumenta a atividade do mentol, principal constituinte ativo desse óleo. Neste presente trabalho, mesmo quando o óleo foi hermeticamente fechado e armazenado à temperatura ambiente ao abrigo de luz, a mentona e o mentol tiveram significativas diminuições de concentração.

A utilização do MSI para a determinação do teor de ergosterol é necessária, visto que, a concentração de ergosterol nas amostras analisadas é baixa. A comparação da atividade do óleo essencial com outros dados da literatura, às vezes, se torna difícil,

devido às diferentes constituições dos óleos essenciais mesmo em plantas de mesma espécie e as diferentes metodologias aplicadas na extração.

ANEXOS:



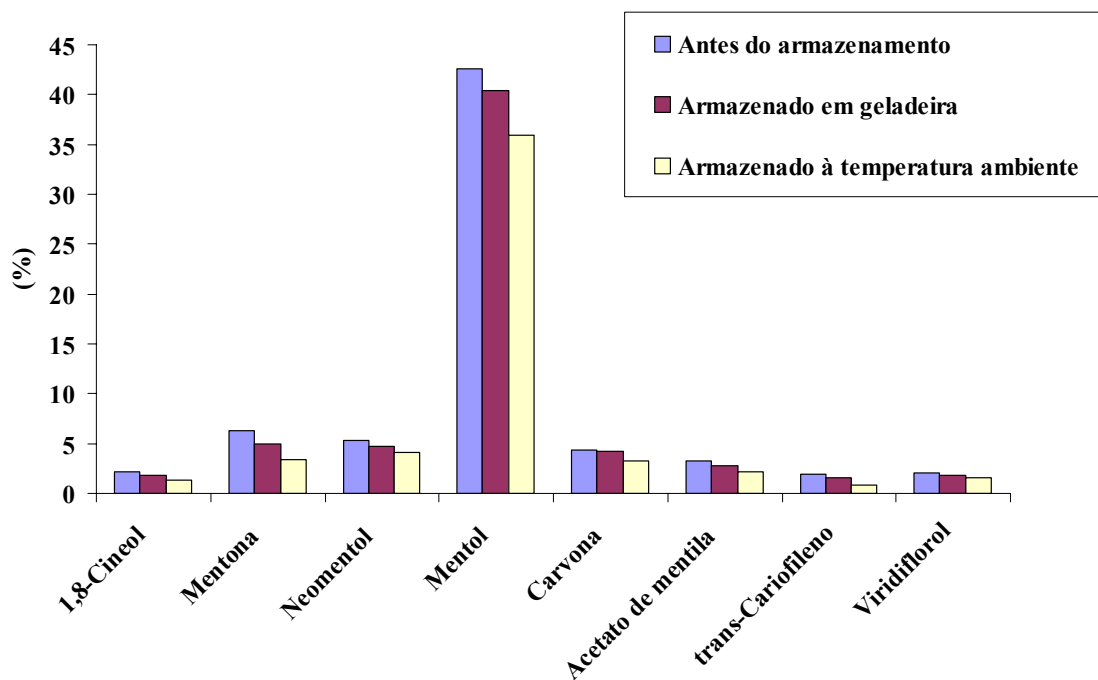
**Figura 1** – Curva padrão do ergosterol obtida através da injeção de soluções de ergosterol em DCM (concentrações de 0,990; 2,439; 4,762; 16,670; 33,330; 50,00; 100,00 ng/μL) no CG-EM, operando no modo de Monitoramento Seletivo de Íons (MSI), cujos íons monitorados foram  $m/z$  55,  $m/z$  69,  $m/z$  143.



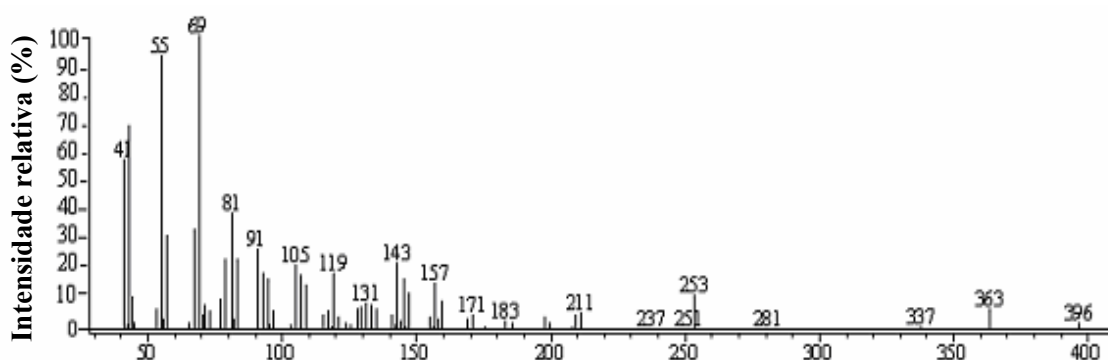
**Tabela 1** – Porcentagem degradada dos oito principais compostos do óleo essencial de *Mentha piperita* L. após o armazenamento por 90 dias em geladeira (4°C) e à temperatura ambiente (25°C). e razão entre as áreas de cada um deles e a área do padrão interno (nonano), antes e após o armazenamento.

Composto	IK*	Razão entre a área do pico do composto e a área do pico do padrão interno (nonano) obtidos por cromatografia gasosa				Degradação do composto (%)	
		Inicial	Depois de armazenado por 90 dias		Depois de armazenado por 90 dias		
			4°C	25°C	4°C	25°C	
1,8-Cineol	1033	0,31	0,26	0,25	18,9	21,3	
Mentona	1154	0,89	0,73	0,67	20,8	33,1	
Neomentol	1165	0,75	0,68	0,67	10,3	12,6	
Mentol	1173	5,98	5,69	5,37	5,1	11,3	
Carvona	1242	0,61	0,60	0,50	2,8	22,4	
Acetato de mentila	1294	0,47	0,40	0,38	16,5	22,1	
<i>trans</i> -Cariofileno	1418	0,27	0,23	0,18	17,8	46,9	
Viridiflorol	1590	0,28	0,26	0,24	6,5	17,4	

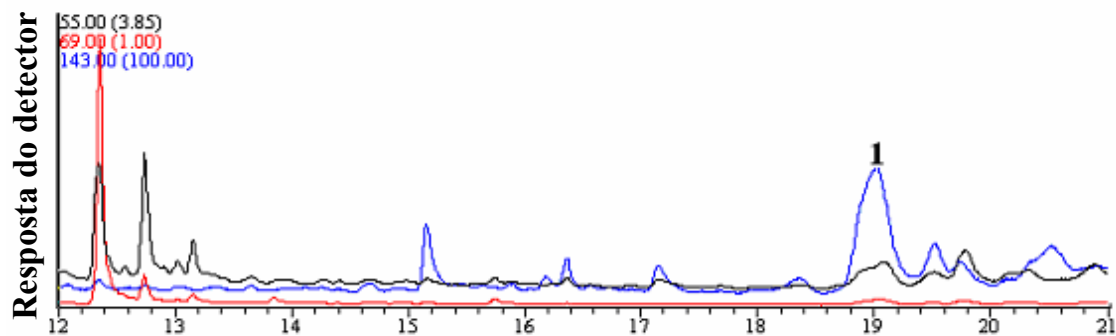
\* Índice de retenção de Kováts, Adams, 1995 (37).



**Figura 2** – Porcentagem dos principais compostos presentes no óleo essencial de *Mentha piperita* L. (1,8-cineol, mentona, neomentol, mentol, carvona, acetato de mentila, *trans*-cariofileno e viridiflorol) antes do armazenamento e após o armazenamento por 90 dias em geladeira (4°C) e à temperatura ambiente (25°C).



**Figura 3** – Espectro de massas do padrão de ergosterol.

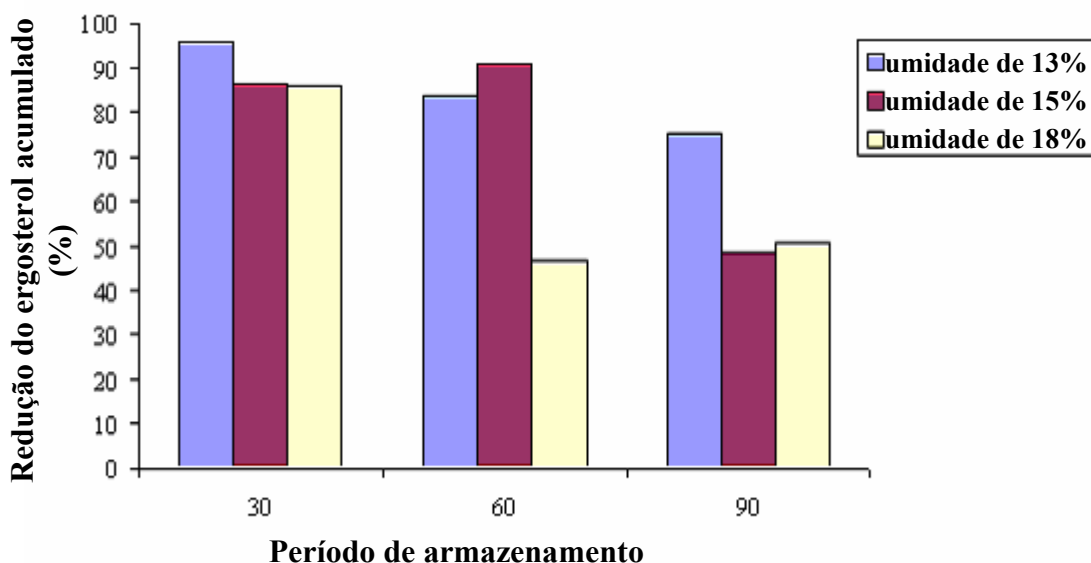


**Figura 4** – Cromatograma de íons parciais típico da amostra do extrato da ração armazenada por 90 dias (repetição 3, umidade 18%, contaminada com fungos) tratada com óleo essencial de *Mentha piperita* L. a 0,2%, obtido por CG-EM. Coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm de espessura do filme, Supelco) revestida com fase estacionária Equity<sup>TM</sup>-5. Programação de temperatura: 150°C, aumento de 15°C/min até atingir 280°C (22 min); fluxo do gás de arraste (hélio ultrapuro) de 1,5 mL/min; temperatura do injetor 260°C; temperatura da interface 280°C; modo de injeção *Splitless*; modo de ionização impacto de elétrons (70 eV); operando no modo MSI. Íons monitorados:  $m/z$  55,  $m/z$  69,  $m/z$  143. O número 1 se refere aos picos relativos aos íons monitorados do ergosterol.

**Tabela 2** – Concentração média de ergosterol em  $\mu\text{g/g}$  de ração encontrada nas amostras de rações, analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), com umidade com umidade de 13, 15 e 18%, armazenadas durante 30, 60 e 90 dias, com e sem tratamento do óleo essencial de *Mentha piperita* L. na concentração de 0,2%.

Tempo (dias)	Umidade da ração (%)	Concentração média de ergosterol em $\mu\text{g/g}$ de ração*	
		Ração sem tratamento (testemunha)	Ração tratada
30	13	0,15 Ab	0,01 Aa
	15	0,27 Ab	0,04 Aa
	18	1,21 Aa	0,17 Ba
60	13	0,29 Ac	0,05 Ab
	15	1,19 Ab	0,11 Bb
	18	6,28 Aa	3,35 Ba
90	13	0,37 Ac	0,09 Ac
	15	1,74 Ab	0,90 Bb
	18	11,44 Aa	5,61 Ba

\*Média de três repetições. As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma linha ou minúscula na mesma coluna e período de tempo não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A concentração média de ergosterol na ração inicial com umidade de 13% foi de 0,05  $\mu\text{g/g}$  de ração.



**Figura 5** – Porcentagem de redução do ergosterol acumulado em ração à base de milho, obtido pelo óleo essencial na concentração de 0,2%, nas umidades de 13%, 15% e 18%, no período 30, 60 e 90 dias de armazenamento a 25°C.

**Tabela 3** - Equações ajustadas para cálculo da concentração de ergosterol em função do tempo para as rações com umidades de 13, 15 e 18%, com e sem tratamento pelo óleo essencial de *M. piperita* a 0,2%.

UMIDADE	FATOR	EQUAÇÕES AJUSTADAS	R <sup>2</sup>
13%	Testemunha	$C = - 0,302930 \times 10^{-4}T^2 + 0,723372 \times 10^{-2}T - 0,382700 \times 10^{-1}$	0,9144
13%	Óleo essencial	$C = 0,260407 \times 10^{-5}T^2 + 0,109074 \times 10^{-2}T - 0,286580 \times 10^{-1}$	0,9747
15%	Testemunha	$C = - 0,204469 \times 10^{-3}T^2 + 0,489727 \times 10^{-1}T - 1,00837$	0,9882
15%	Óleo essencial	$C = 0,398522 \times 10^{-3}T^2 - 0,335233 \times 10^{-1}T + 0,684766$	0,9944
18%	Testemunha	$C = 0,558722 \times 10^{-4}T^2 + 0,163674 T - 3,74565$	0,9950
18%	Óleo essencial	$C = - 0,505619 \times 10^{-3}T^2 + 0,151404T - 3,91778$	0,9333

## CONCLUSÕES GERAIS

As análises cromatográficas possibilitaram a identificação de 57 compostos no óleo essencial de *M. piperita* e mostraram que eles são, em sua maior parte, monoterpenos e que o mentol é o principal componente desse óleo essencial.

Através da avaliação da atividade antifúngica, *in vitro*, pelo ensaio “poison food”, foi possível comprovar que o óleo essencial apresenta efeito inibitório sobre o crescimento micelial dos fungos, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. glaucus*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *C. musae* e *C. gloeosporioides*.

Utilizando-se da quantificação de ergosterol por CG-EM operado no modo MSI foi possível avaliar e comprovar o potencial do óleo essencial em controlar a contaminação fúngica em ração armazenada.

O fracionamento do óleo essencial e a avaliação *in vitro* do potencial antifúngico das subfrações ativas, apontaram o mentol como um dos componentes responsáveis pela atividade antifúngica do óleo essencial, porém, foi possível perceber que além dele, existem outros compostos com potencial antifúngico presentes nesse óleo.

Pela avaliação da estabilidade do óleo essencial de *M. piperita* foi possível demonstrar que os seus principais compostos não são estáveis ao armazenamento, por 90 dias, em geladeira a 4°C, e é muito menos estável à temperatura ambiente. Essa análise pôde provar que houve consideráveis diferenças entre a porcentagem inicial desses compostos e a porcentagem deles após o armazenamento. Através dessa avaliação foi possível perceber que o *trans*-cariofileno foi o composto mais instável à temperatura ambiente e a mentona e o 1,8-cineol os mais estáveis em geladeira. Além disso, essa avaliação mostrou que o óleo essencial como um todo é bem mais estável à temperatura mais baixa.

Enfim, estudos mais elaborados são necessários para sabermos se a utilização do óleo de *M. piperita* ou de alguns de seus componentes é uma alternativa segura e viável para o controle de fungos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. M. I. P. M. Lima, J. A. Portella, G. Arias, Fungos de grãos de cereais de inverno, Embrapa (2005).
2. L. A. A. P. Pasin, M. S. Abreu, S. M. Chalfoun, T. R. P. de Pádua, Efeito de micronutrientes na população fúngica associada a grãos de café (*Coffea arabica* L.), Ciênc. agrotec., Lavras, 26, 918-926 (2002).
3. J. S. Silva, Secagem e armazenagem de produtos agrícolas, Editora: Aprenda fácil-Viçosa, 104-105 (2000).
4. A. Márcia, F.A. Lazzari, Monitorament of fungi in corn, grits and corn meal, Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal do Paraná, (1998).
5. A. A. Borges, A. Borges-Pérez e M. Fernández-Falcón, Induced resistance to fusarial wilt of banana by menadione sodium bisulphite treatments, Crop Protection, 23, 1245–1247 (2004).
6. J. A. Bailey e M. J. Jeger, Colletotrichum: Biology, Pathology and Control., Edited for the British Society for Plant Pathology, 388p. (1992).
7. L. Zambolim, F. X. R. do Vale, A. J. A. Monteiro, H. Costa, Controle de doenças de plantas : frutíferas, 2, 839-1095 (2002).
8. Q. Kritzinger, T. A. S. Aveling, W. F. O. Marasas, Effect of essential plant oils on storage fungi, germination and emergence of cowpea seeds, Seed Science and Technology, 30(3), 609-619, (2002).
9. L. Zambolim e F. X. R. Vale, Controle de doenças de plantas: módulo 7.3 - Fungicidas de contato Brasília, 138p (2002).
10. Embrapa, As doenças da Pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth): Antracnose e podridão da medula, Comunicado Técnico, 63 (2001).
11. S. J. Michereff, Herbário virtual de fitopatologia, UFRPE - Depto de Agronomia - Setor Fitopatologia. <http://faem.ufpel.edu.br/dfs/herbario/index.php> (2006)
12. R. Ghini, Resistência de fungos a fungicidas, FeSBE - Federação de Sociedades de Biologia Experimental, <http://www.fesbe.org.br> (2006).

13. C. L. Wilson, M. E. Wisniewski, Future alternatives to synthetic fungicides for control of postharvest diseases, In Tjamos ET. Ed., Biological control of plant diseases, New York, Plenum Press, 133-138 (1992).
14. K. Zaki, I. J. Misaghi, A. Heydari, Control of cotton seeding damping off in the field by *Burkholderia (pseudomonas) cepacia*, Plant disease, 82, 291-293 (1997).
15. M. E. Guynot, A. J. Ramos, L. Seto, P. Purroy, V. Sanchis, S. Marin, Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products, Journal of Applied Microbiology, 94(5), 893-899 (2003).
16. M. C. T. Duarte, G. M. Figueira, A. Sartoratto, V. L. G. Rehder, C. Delarmelina, Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants, Journal of Ethnopharmacology, 97, 305–311 (2005).
17. R. M. Belmont and M. Carvajal, Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components, Journal of Food Protection. 61, 616-619 (1998).
18. L. B. Luna, K. B. Torres, R. M. Belmont, Inhibition of mycelial growth and sporulation of *Fusarium moniliforme* Sheld. using essential acids from plants and several of their chemical components, Revista Mexicana de Fitopatologia, 16(1), 18-23 (1998).
19. S. R. Sridhar, R. V. Rajagopal, R. Rajavel, S. Masilamani, and S. Narasimhan, Antifungal Activity of Some Essential Oils, Journal of Agricultural Food Chemistry, 51, 7596-7599 (2003).
20. M. Maffei and M. Mucciarelli, Essential oil yield in peppermint/soybean strip intercropping, Field Crops Research, 84, 229–240 (2003).
21. G. Maranca, Plantas aromáticas na alimentação, Editora Nobel, 63-64 (1985).
22. A. M. Domijan, M. Peraica, V. Zlender, B. Cvjetković, Topolovec-Pintarić Jurjević e Ivić D, Seed-borne fungi and *ochratoxina A* contamination of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Republic of Croatia, Food and Chemical Toxicology, 43, 427-432 (2005).
23. J. W. Dorner e R. J. Cole, Effect of application of nontoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on subsequent aflatoxin contamination of peanuts in storage, Journal of Stored Products Research, 38, 329–339 (2002).
24. R. M. Belmont, H. E. F. Moctezuma, Sorghum seeds treated with natural products for the control of *Fusarium thapsinum* and *Claviceps Africana*, Manejo Integrado de Plagas, 61, 23-30 (2001).



25. Q. Kritzing, T. A. S. Aveling, W. F. O. Marasas, Effect of essential plant oils on storage fungi, germination and emergence of cowpea seeds, *Seed Science and Technology*, 30(3), 609-619 (2002).
26. M. A. Ansari, P. Vasudevan, M. Tandon, R. K. Razdan, Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (*Mentha piperita*) oil, *Bioresource Technology*, 71, 267-271 (2000).
27. A. E. Edris e E. S. Farrag, Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase, *Nahrung*, 47(2), 117-121 (2003).
28. S. P. S. S. Diniz, H. Utumi, F. Bonzanini, M. C. Queiroz, Controle do fungo *Myrothecium verrucaria* por óleos essenciais, *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 6(1), 60-62 (2003).
29. Pankaj, Sharma, S. D. Singh, P. Rawal, Antifungal activity of some plant extracts and oils against seed-borne pathogens of pea, *Plant Disease Research Ludhiana*, 18(1), 16-20 (2003).
30. A. Schuhmacher, J. Reichling, P. Schnitzler, Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro, *Phytomedicine*, 10: 504–510 (2003).
31. S. Pattnaik, V. R. Subramanyam, C. Kole, Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro, *Microbios*, 86(349), 237-246 (1996).
32. R. Pandey, A. Kalra, S. Tandon, N. Mehrotra, H. N. Singh, S. Kumar, Essential oils as potent sources of nematocidal compounds, *Journal of Phytopathology*, 148(7/8), 501-502 (2000).
33. E. S. J. Niridy, Structure-fungitoxicity relationships of the monoterpenoids of the oils of peppermint (*Mentha piperita*) and Scented Geranium (*Pelargonium graveolens*), *J. Essent. Oil Res.*, 10, 628-631 (1998).
34. A. Zambonelli, A. Zechini D'Aulerio, A. Bianchi, A. Albasini, Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro, *Journal of Phytopathology*, 144(9/10), 491-494 (1996).
35. C. Gherman, M. Culea, O. Cozar, Comparative analysis of some active principles of herb plants by GC/MS, *Talanta*, 53, 253–262 (2000).
36. M. L. N. Costa, J. C. Machado, R. M. Guimarães, E. A. Pozza, D. Oride, Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica, *Ciênc. agrotec.*, Lavras, 27 (5), 1023-1030 (2003).

37. L. F. Ribeiro, I. B. Bedendo, Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* – Agente causal da podridão de frutos do mamoeiro, *Scientia Agrícola*, 56, 1267-1271 (1999).
38. O. D. Dhingra e J. B. Sinclair, *Basic Methods in Plant Pathology*, CRC press, Boca Raton, Florida, 458(1995).
39. R. F. EUCLYDES, Manual de utilização do programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas), Viçosa – UFV 59p. (1983).
40. R. P. Adams, *Identification of essential oil components by Gas Chromathography/Mass Espectroscopy*, Allured Publishing Corporation, (1995).
41. M. M. Martins, S. B. Costa, C. Neves, C. Cavaleiro, L. Salgueiro, M. L. B. Costa, Olive oil flavoured by the essential oils of *Mentha · piperita* and *Thymus mastichina* L., *Food Quality and Preference*, 15, 447–452(2004).
42. M. L. Ruiz del Castillo, G. P. Blanch and M. Herraiz, Natural variability of the enantiomeric composition of bioactive chiral terpenes in *Mentha piperita*, *Journal of Chromatography A*, 1054, 87–93 (2004).
43. B. Voirin and C. Bayet, Developmental changes in the monoterpene composition of *Mentha x piperita* leaves from individual peltate trichomes, *Phytochemistry*, 43, 573-580 (1996).
44. H. J. S. Dhaliwal, T. S. Thind, C. Mohan, Fungitoxic potential of ten essential oils against *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc., *Pesticide Research Journal*, 15(2), 142-144 (2003).
45. P. Baruah, R. K. Sharma, R. S. Singh, A. C. Ghosh, Fungicidal activity of some naturally occurring essential oils against *Fusarium moniliforme*, *Journal of Essential Oil Research*, 8, 411-412 (1996).
46. M. E. Guynot, A. J. Ramos, L. Seto, P. Purroy, V. Sanchis, S. Marin, Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products, *Journal of Applied Microbiology*, 94(5), 893-899 (2003).
47. S. N. EL-Sherbieny, W. H. Zakey, S. M. A. Ghafor, Antifungal action of some essential oils against fungi causing cotton seedling damping-off disease, *Of Agricultural Science Cairo*, 47(3), 1009-1020 (2002).
48. L. Giamperi, D. Fraternali, D. Ricci, The in vitro action of essential oils on different organisms, *Journal of Essential Oil Research*, 14(4), 312-318 (2002).

49. P. Dilkin, R. Hasegawa, T. A. R., C. A. Mallmann, B. Corrêa, Experimental intoxication of pigs by fumonisins, *Intoxicação experimental de Ciência Rural*, Santa Maria, 34, 175-181 (2004).
50. M. Maffei, D. Canova, C. M. Berteza, S. Scannerini, UV-A effects on photomorphogenesis and essential-oil composition in *Mentha piperita*, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 52, 105–110 (1999).
51. M. M. Freire, G. N. Jham, O. D. Dhingra, Avaliação da atividade antifúngica e identificação dos compostos no óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), (a ser submetido para publicação no *Journal of Agricultural Food Chemistry*).
52. S. Y. Newell, T. L. Arsuffi, R. D. Fallon, Fundamental produceres for determining ergosterol content of decaying plant material by liquid chromatography, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1876 – 1879 (1988).
53. M. F. P. M. Castro, N. Bragagnolo, S. R. T. Valentini, The relationship between fungi growth and aflatoxin production with ergosterol content of corn grains, *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, 22-26 (2002).
54. R. J. Q. Moraes, C. A. A. Almeida, P. Dilkin, C. H. Kowalski, L. Mürmann, C. A. Mallmann, Dosage of ergosterol as an indicator of fungi contamination of stored maize. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 70, 483-489 (2003)
55. L. M. Seitz & Y. Pomeranz, Ergosterol, Ergosta-4, 6, 8 (14), 22-tetraen-3-one, ERG Peroxide, and chitin in ergoty barley, rye, and other grasses, *J. Agric. Food Chem.*, 31, 1036-1038 (1983).
56. L. M. Seitz, D. B. Sauer, R. Burroughs, H. E. Mohr, J. D. Hubbard, Ergosterol as measure of fungal growth, *Phytopathology*, 69, 1202- 1203 (1979).