

## VARIAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Hyptis suaveolens* (L.) POIT., SOB CONDIÇÕES DE CULTIVO

Felipe Terra Martins\*, Marcelo Henrique dos Santos e Marcelo Polo

Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, 37130-000 Alfenas - MG, Brasil

Luiz Cláudio de Almeida Barbosa

Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000 Viçosa - MG, Brasil

Recebido em 31/8/05; aceito em 15/3/06; publicado na web em 25/7/06

CHEMICAL VARIATION IN THE ESSENTIAL OIL OF *Hyptis suaveolens* (L.) POIT., UNDER CULTIVATION CONDITION. This study was performed to establish the correlation between the growth conditions and essential oil composition of *Hyptis suaveolens* from Alfenas (MG), Brazil. The plants were grown in a greenhouse, four treatments were used and they were harvested at two different periods of time (60 and 135-day-old plants). The essential oil composition was determined by GC-MS analysis. The terpenes spathulenol, globulol, dehydroabietol,  $\alpha$ -cadinol and  $\beta$ -phellandrene were the major constituents found in the essential oil. Oxygenated sesquiterpenes represented the main group of constituents in most of the treatments. The major changes in the essential oil composition were found in 135-day-old plants grown under NPK deficiency. We also identified three groups of volatile components that have not been previously described in *H. suaveolens*.

Keywords: *Hyptis suaveolens*; essential oil; chemical variability.

### INTRODUÇÃO

*Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae) é uma planta anual, com altura oscilando entre 1,0 e 2,0 m na fenofase de frutificação<sup>1</sup>. É uma espécie preferencialmente alógama, porém apresenta autopolinização como estratégia de adaptação às condições inóspitas à troca de material genético<sup>2</sup>. Conhecida no nordeste do Brasil como bamburral e no sul e sudeste como erva-canudo, é considerada invasora de lavouras de milho e de pastagens<sup>3</sup>. No México é conhecida como chía de colima, chía gorda, chía grande, conibare e goyohuali. Além de ser uma espécie ruderal<sup>4</sup>, crescendo naturalmente em ambientes abertos e secos, sendo raramente encontrada em altitudes inferiores a 500 m<sup>5</sup>, é cultivada para uso doméstico<sup>6</sup>.

O óleo essencial de *H. suaveolens* é constituído principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos, sendo estes sintetizados nas células de tricomas glandulares e armazenados no interior de uma cápsula situada no ápice do pêlo glandular<sup>7</sup>. O óleo essencial desta espécie já foi caracterizado quimicamente em vários estudos<sup>5,7-13</sup>, tendo sido verificada elevada variabilidade na composição e no teor dos constituintes majoritários. Estas diferenças foram atribuídas à origem geográfica das plantas<sup>8-11</sup>. Porém, populações naturais de plantas que ocorrem ao longo de um gradiente ambiental variam quanto a constituição genética e atividade fisiológica e, embora pertencendo à mesma espécie, podem responder de modo muito diferente às condições ambientais vigentes. Portanto, a procedência distinta de plantas de *H. suaveolens* pode ser um fator de variabilidade genética, uma vez que a biodiversidade envolve o metabolismo das plantas e seus produtos<sup>14</sup>, ou pode indicar um padrão de variação geográfica na composição do óleo essencial.

O óleo essencial de *H. suaveolens* tem sido estudado quanto a sua ação anti-séptica<sup>15</sup>, anticarcinogênica<sup>16</sup>, antibacteriana<sup>12,15,17</sup>, antifúngica<sup>18,19</sup>, larvicida contra *Aedes aegypti*<sup>20</sup>, anticonvulsivante<sup>21</sup> e nematocida<sup>22</sup>.

Fatores como variabilidade genética intra-específica, condições ambientais, épocas de colheita, condições de cultivo, tipo de solo e parte da planta analisada podem influenciar no teor e na composição química dos óleos essenciais<sup>23</sup>. Todos esses aspectos são de fundamental importância quando se realiza o desenvolvimento de trabalhos de melhoramento de uma espécie medicinal visando a aplicação fitoterápica, uma vez que a qualidade dos óleos essenciais está ligada a sua constituição química.

Neste trabalho foi estudada a relação existente entre algumas variáveis que podem estar relacionadas com a variação no teor e na composição do óleo essencial de plantas de *H. suaveolens* cultivadas em casa de vegetação. Para isso, foram avaliadas as influências das seguintes variáveis: idade da planta (60 e 135 dias) e os fatores ambientais fotoperíodo e disponibilidade de macronutrientes. Também foram estabelecidas correlações entre estágios do desenvolvimento das plantas e a composição química do óleo essencial. Para minimizar a interferência da variabilidade genética intraespecífica, as plantas submetidas aos tratamentos descenderam de dois exemplares de mesma linhagem, provenientes de uma população de plantas autógamias, seguras à autopolinização restrita por seis gerações consecutivas.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Localização

A cidade de Alfenas está localizada nas coordenadas de 21° 27' LS e 45° 56' LW, a uma altitude de 880 m, com clima tropical moderado úmido, sendo a temperatura média do mês mais frio de 13 a 16 °C e a do mês mais quente de 21 a 23 °C. O inverno tem de 2 a 4 meses secos com déficit hídrico pequeno, entre 10 a 30 mm. Seu regime de precipitações médias fica entre 1.400 a 1.700 mm, sendo o seu regime de distribuição periódica, predominando no período mais quente do ano. A umidade relativa do ar apresenta média anual em torno de 70%.

\*e-mail: felipetmartins@yahoo.com.br

## Cultivo das plantas

### Obtenção das núculas para semeadura

Plantas de *H. suaveolens* vêm sendo cultivadas no viveiro da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), a fim de se obter uma linhagem em homozigose<sup>2</sup>. Para isto, indivíduos de uma população cultivada em Alfenas foram submetidos a seis ciclos de autofecundação restrita<sup>2</sup>, sendo realizado o primeiro ciclo a partir de um único exemplar. O isolamento dos exemplares foi feito através de individualizações em celas existentes no viveiro. Desta forma, as núculas de *H. suaveolens* utilizadas na semeadura das plantas experimentais foram colhidas de 2 indivíduos na fase de dispersão das sementes, procedentes da sexta geração de ciclos autógamos (F6), selecionados aleatoriamente. A colheita foi feita manualmente e as sementes foram escolhidas, descartando-se as imaturas, danificadas e chochas, e armazenadas em sacos de papel em condições ambientais até o momento da semeadura.

### Local de cultivo e preparo do substrato: grupos experimentais

Plantas de *H. suaveolens* foram cultivadas em casa de vegetação na área do viveiro da UNIFAL-MG, entre os meses de agosto de 2004 e março de 2005. Foi preparado 0,4 m<sup>3</sup> de substrato, composto de solo e areia, proporção 3:2 (v/v).

O substrato foi dividido em duas partes de 0,2 m<sup>3</sup>. Em uma delas, foi adicionado adubo químico (grupo NPK) nas quantidades de 28,3 g de cloreto de potássio; 497,8 g de fosfato de cálcio e 235 g de sulfato de amônio; finalizando uma proporção de 100 g/m<sup>3</sup> de potássio; 500 g/m<sup>3</sup> de fósforo e 250 g/m<sup>3</sup> de nitrogênio. Na outra parte os nutrientes não foram incorporados (grupo deficiente), permanecendo com 2,2 g/m<sup>3</sup> de fósforo; 26 g/m<sup>3</sup> de potássio e 0 g/m<sup>3</sup> de nitrogênio.

Para cada grupo experimental foram tomados 12 recipientes plásticos com capacidade de 14 L, sendo cultivadas 6 plantas em cada recipiente. Após 30 dias da semeadura, metade dos recipientes de cada grupo experimental permaneceu em condições de luz ambiente, em fotoperíodo natural. A outra metade dos recipientes foi mantida em fotoperíodo longo, que correspondeu ao fotoperíodo natural com complemento de 4 h de luz artificial.

Dessa forma, foram obtidos os 4 grupos experimentais, referentes às 2 condições de nutrientes e 2 condições de fotoperíodo (Tabela 1). Durante os dias subsequentes à preparação do substrato e até as plantas completarem 30 dias de emergência, os recipientes foram irrigados diariamente. Após este período, os recipientes foram irrigados em dias intercalados, tomando-se o cuidado de evitar a percolação do substrato e perda dos nutrientes.

### Colheita das plantas, extração e análise quantitativa do óleo

As colheitas foram realizadas em duas épocas diferentes. Na primeira, as plantas tinham cerca de 60 dias de idade (de 18 a 22 de novembro de 2004; fotoperíodo de 13 h) e na segunda colheita tinham cerca de 135 dias (03 a 07 de fevereiro de 2005; fotoperíodo de 12 h 55 min). Foi considerada a emergência das plântulas como a data de início do experimento (20 de setembro de 2004). As plantas

mantidas sob fotoperíodo natural de Alfenas (13 h) estavam floridas na primeira colheita e frutificadas aos 135 dias de idade. Já as plantas cultivadas em fotoperíodo natural complementado de 4 h de luz artificial permaneceram vegetativas em ambas as colheitas. Em cada tratamento foram colhidas as partes aéreas de 18 plantas que constituíram uma amostra homogênea<sup>10</sup>, e as extrações de óleo essencial foram realizadas em três repetições. As plantas foram colhidas às 9:00 h e imediatamente submetidas à hidrodestilação por 6 h em aparelho do tipo Clevenger. A mistura resultante de água e óleo essencial foi coletada e o óleo foi extraído com diclorometano (3 x 30 mL), secado com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro (0,1 g) e o solvente orgânico foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotativo à 30 °C. Os frascos contendo o óleo essencial foram saturados com N<sub>2</sub> gasoso, vedados hermeticamente e conservados a -10 °C até o momento das análises. O teor do óleo essencial foi obtido através da razão entre a massa do óleo e a massa do resíduo vegetal seco (% m/m). Após a extração do óleo essencial de cada amostra, o resíduo vegetal foi mantido em estufa à temperatura de 110 °C até atingir massa constante (massa do resíduo vegetal seco). Uma amostra do material vegetal foi identificada, herborizada e incorporada ao acervo do Herbário da Universidade Federal de Alfenas sob o número HEFOA 00189.

### Análise do óleo essencial

As amostras de óleo foram analisadas por cromatografia gasosa, utilizando aparelho Shimadzu GC-17A equipado com detector de ionização de chama (FID), e também por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM), usando aparelho Shimadzu GCMS-QP5050A. As condições cromatográficas, em ambas as análises, foram coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,22 mm) com fase estacionária DB5 (0,25 µm de espessura de filme); N<sub>2</sub> (ou He nas análises por CG-EM) como gás de arraste com fluxo de 1,8 mL/min, a temperatura foi programada mantendo 60 °C por 2 min, seguido de um aumento de 3 °C/min até atingir 240 °C, mantendo esta temperatura constante por 15 min; temperatura do injetor de 220 °C; temperatura do detector (ou interface) de 240 °C; foi injetado um volume de 1,0 µL (solução 1% de óleo essencial em diclorometano); taxa de partição do volume injetado de 1:10 e pressão na coluna de 166 kPa. As condições do EM foram detector de captura iônica operando por impacto eletrônico e energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos/s e fragmentos detectados de 29 a 400 Da. Cada componente foi identificado através da comparação de seu espectro de massas com espectros existentes na literatura<sup>24</sup>, com espectros avaliados pelo banco de dados (Wiley 330.000) do equipamento e, também, pela comparação dos índices de retenção com aqueles da literatura<sup>24,25</sup>. Os índices de retenção de Kovats (IK) foram determinados utilizando uma curva de calibração de uma série de *n*-alcanos (C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub>) injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras. A concentração dos constituintes foi calculada através da área integral de seus respectivos picos, relacionada com a área total de todos os constituintes da amostra, obtida pela análise utilizando cromatógrafo a gás com detector de ionização de chamas (FID).

**Tabela 1.** Tratamentos empregados no cultivo de *H. suaveolens*, Alfenas - Minas Gerais, e suas respectivas siglas

Tratamentos	Siglas	
	Colheita 1	Colheita 2
Suplemento de NPK e Fotoperíodo Normal	3C1	3C2
Suplemento de NPK e Fotoperíodo Normal + Complemento de 4 h de luz	3L1	3L2
Deficiente e Fotoperíodo Normal	CC1	CC2
Deficiente e Fotoperíodo Normal + Complemento de 4 h de luz	CL1	CL2

## Análise estatística

As concentrações dos principais constituintes detectados foram submetidas ao teste  $\chi^2$  para comparação de duas proporções<sup>26</sup>, sendo confrontadas as concentrações de um mesmo composto em duas amostras distintas, variando entre estas apenas uma das condições de cultivo das plantas. Os resultados destas comparações foram expressos em valores de *P* para as diferenças, sendo admitida significância quando  $P < 0,05$ . As concentrações dos grupos de metabólicos especiais foram sujeitas ao mesmo teste, porém as comparações foram realizadas em duas dimensões, horizontalmente quando as concentrações de um único grupo de metabólicos foram testadas entre os oito tratamentos, objetivando identificar concentrações diferentes entre os tratamentos, e verticalmente quando as concentrações de todos os grupos detectados foram comparadas dentro de um único tratamento, no intuito de eleger classe(s) majoritária(s). Em todas as análises foi adotado grau de significância 5%, com 1 grau de liberdade calculado pelo produto entre as duas parcelas representadas pelo número de colunas subtraído de 1 e pelo número de linhas também subtraído de 1. O número de colunas e de linhas foi sempre 2, pois em todos os casos foram comparadas duas porcentagens. A frequência esperada foi obtida admitindo-se a hipótese de neutralidade, onde as duas porcentagens foram consideradas iguais entre si. Assim, a frequência esperada consistiu nas médias dos valores percentuais confrontados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de óleo essencial encontrados nas amostras referentes aos quatro tratamentos são apresentados na Tabela 2. Verifica-se que as plantas dos tratamentos deficientes em NPK e colhidas com 135 dias apresentaram maiores teores de óleo. Foram encontrados valores de 0,41% de óleo para a amostra CC2 e 0,45% para a amostra CL2. Para todos os quatro tratamentos, os teores de óleo essencial obtidos foram menores nas plantas colhidas após 60 dias (variando de 0,16 a 0,30%) em relação às colhidas aos 135 dias. Em todos os casos, esses teores de óleo são bem superiores aos encontrados para plantas de *H. suaveolens* cultivadas em Viçosa<sup>7,27</sup>, cujas partes aéreas floridas forneceram 0,035% de óleo. Os teores de óleo produzidos por plantas de *H. suaveolens* variam muito, podendo chegar até a 1,5%, conforme relatado para plantas nativas da Nigéria<sup>12</sup>.

**Tabela 2.** Teor do óleo essencial nas amostras de *H. suaveolens* cultivadas em Alfenas

Tratamentos *	Teor do óleo (% m/m)	
	Colheita 1	Colheita 2
CC	0,19	0,41
CL	0,30	0,45
3C	0,17	0,21
3L	0,16	0,25

\* Os significados das siglas CC, CL, 3C e 3L encontram-se na Tabela 1.

A análise das oito amostras de óleo essencial obtidas resultou na identificação de 65 compostos (Tabela 3), tendo a grande maioria já sido identificada no óleo de *H. suaveolens*<sup>7</sup>. Os componentes encontrados em maiores quantidades nas oito amostras aparecem em negrito na Tabela 3. De modo geral, observa-se que as oito amostras analisadas possuem diferenças qualitativas e quantitativas em termos de seus constituintes químicos. Os óleos correspondentes às

amostras CC1 e CL1 não apresentaram nenhum componente com teor acima de 10%, ao contrário das demais seis amostras que apresentaram compostos com teores de quase 20%. Por ex., o espatulenol foi o componente presente em maior quantidade, tendo seu teor variado de 16,13 a 19,60% nas amostras CC2, CL2, 3C1, 3L1, 3C2 e 3L2. O teor de globulol também foi superior a 10% (variando de 11,22 a 14,85%) nas amostras de óleo das plantas cultivadas com suplemento NPK. O diterpeno desidroabietol apresentou elevados teores nas amostras CC2 (16,80%) e CL2 (14,55%), enquanto nas demais amostras seu teor foi bem menor, chegando a apenas 2,23% na amostra 3C1.

Espatulenol foi o constituinte majoritário do óleo essencial de algumas amostras de *H. suaveolens* provenientes do Cerrado Brasileiro<sup>9,10</sup>, porém a composição química destas amostras difere dos resultados deste trabalho. Estas diferenças são evidenciadas nos elevados teores de (*E*)-cariofileno, óxido de cariofileno<sup>10</sup> e de 1,8-cineol<sup>9</sup>, enquanto que no presente estudo as amostras apresentaram altas concentrações de globulol e desidroabietol. A composição química do óleo das amostras de plantas cultivadas no grupo NPK apresentou similaridade com o óleo essencial extraído de folhas e caules de plantas provenientes de Viçosa, Brasil<sup>7,27</sup>.

Amostras de plantas cultivadas no grupo deficiente e colhidas na primeira época de colheita apresentaram importantes diferenças entre os constituintes majoritários encontrados nas demais amostras, sendo verificadas elevadas proporções de  $\gamma$ -cadineno (8,41% para CC1 e 3,43% para CL1) e  $\alpha$ -T-bergamoteno (5,98% para CC1 e 5,55% para CL1) e baixas concentrações relativas de espatulenol (6,78% para CC1 e 3,48% para CL1) e globulol (4,14% para CC1 e 5,54% para CL1). Estas variações devem estar relacionadas à deficiência de NPK associada à idade da planta (60 dias).

Neste trabalho foram identificadas três classes de compostos voláteis ainda não descritos no óleo essencial de *H. suaveolens*: álcoois alifáticos (octen-3-ol e octan-3-ol), cetona aromática (*p*-metilacetofenona) e diterpenos oxigenados (óxido de manoil, 4-*epi*-abietol, desidroabietol e abietol). Também foram identificados os diterpenos não oxigenados abietatrieno, abietadieno e abieta-7,13-dien-3-ona. As concentrações dos álcoois alifáticos (variando entre 0,00 e 0,78%), cetona aromática (variando entre 0,00 e 0,69%) e dos diterpenos não oxigenados (variando entre 1,77 e 4,95%) não foram alteradas significativamente pelos tratamentos (Tabela 4).

Os diterpenos oxigenados, encontrados em todas as amostras, foram produzidos principalmente nas plantas do grupo deficiente em NPK, especialmente as colhidas aos 135 dias (24,10% para CC2 e 27,22% para CL2) (Tabela 4). As maiores concentrações de diterpenos oxigenados nas amostras de plantas colhidas na segunda época de colheita podem estar relacionadas à idade das plantas, quando o crescimento vegetativo (divisão celular) ocasiona um aumento do número de cloroplastos, o que resulta em maior atividade fotossintética<sup>28</sup>. Conseqüentemente, isto acarretaria aumento do estresse por oxigênio que, depois de liberado, passa freqüentemente por uma série de transformações monoelétrônicas, produzindo intermediários radiculares de alta reatividade. Desta forma, a inativação de tais radicais é indispensável para manutenção da estabilidade celular, sendo que nas plantas os sistemas antioxidantes eliminadores de espécies ativas de oxigênio envolvem o metabolismo especial. Um destes sistemas inclui micromoléculas derivadas do acetato, entre elas os terpenóides, servindo de captadores de oxigênio<sup>29</sup>. Tal hipótese evolucionista associada a processos fisiológicos embasa um possível padrão de oxidação dos diterpenos dependente da idade da planta, para o genótipo da população de plantas cultivadas em Alfenas.

As concentrações dos sesquiterpenos não oxigenados foram maiores em amostras de plantas colhidas na primeira época de colheita

**Tabela 3.** Porcentagem dos componentes do óleo essencial de *H. suaveolens* obtido de plantas cultivadas em diferentes tratamentos

Nº	IK <sup>1</sup>	Componente	Área % em tratamentos * deficientes em NPK				Área % em tratamentos * suplementados em NPK			
			CC1	CL1	CC2	CL2	3C1	3L1	3C2	3L2
1	939	$\alpha$ -Pineno	-	-	-	-	0,18	-	-	-
2	978	Octen-3-ol	0,78	-	-	-	-	-	-	-
3	991	Mirceno	-	-	-	-	-	-	0,36	0,33
4	995	Octan-3-ol	-	-	-	-	0,18	-	-	-
5	1003	$\alpha$ -Felandreno	-	3,55	-	0,59	0,26	0,31	0,25	-
6	1018	$\alpha$ -Terpineno	2,08	1,97	-	-	-	-	-	-
7	1026	p-Cimeno	-	-	0,39	-	0,36	0,28	-	0,42
<b>8</b>	<b>1029</b>	<b><math>\beta</math>-Felandreno</b>	<b>3,17</b>	<b>2,96</b>	<b>2,53</b>	<b>2,29</b>	<b>3,96</b>	<b>3,48</b>	<b>3,50</b>	<b>3,86</b>
9	1030	Limoneno	-	-	-	-	0,21	-	-	-
10	1036	1,8- Cineol	-	-	-	-	0,92	-	-	-
11	1062	$\gamma$ -Terpineno	1,75	1,87	-	0,77	1,17	0,92	1,01	0,49
12	1082	Fenchona	-	-	-	-	0,29	-	-	-
13	1091	$\alpha$ -Terpinoleno	-	-	-	-	0,13	-	-	-
14	1101	Linalol	-	-	-	-	0,52	-	-	-
15	1109	Fenchol	-	-	-	-	0,18	-	-	-
16	1147	Cânfora	-	-	-	-	0,35	-	-	-
17	1166	Borneol	1,56	0,95	-	-	0,81	1,59	0,40	0,93
18	1173	Terpinen-4-ol	2,20	0,58	-	-	0,88	0,63	0,50	2,28
19	1178	p-metilacetofenona	-	-	-	-	0,63	0,32	-	0,69
20	1183	p-Cimen-8-ol	-	-	0,13	-	-	-	-	-
21	1189	$\alpha$ -Terpineol	-	-	-	-	0,27	-	-	-
22	1370	$\alpha$ -Ilngeno	-	0,46	-	-	0,35	0,25	-	0,26
23	1378	$\alpha$ -Copaeno	0,93	0,47	-	-	2,09	1,29	1,07	1,52
24	1386	$\beta$ -Bourboneno	-	0,37	-	-	0,96	0,86	-	0,65
25	1391	$\beta$ -Elemeno	-	0,37	-	-	0,50	-	-	-
26	1405	(Z)-Cariofileno	-	0,29	-	-	-	-	-	-
27	1413	$\alpha$ -Gurjuneno	-	0,36	-	-	0,34	0,33	-	0,28
28	1423	(E)-Cariofileno	-	1,36	-	-	2,23	3,59	2,42	1,93
29	1432	$\beta$ -Gurjuneno	-	-	0,32	-	-	-	-	-
30	1433	$\gamma$ -Elemeno	-	0,35	0,55	0,63	0,76	0,47	-	0,90
<b>31</b>	<b>1434</b>	<b><math>\alpha</math>-T-Bergamoteno</b>	<b>5,98</b>	<b>5,55</b>	<b>0,43</b>	<b>0,69</b>	<b>1,19</b>	<b>2,31</b>	<b>2,37</b>	<b>0,72</b>
32	1440	Aromadendreno	-	-	-	-	0,13	-	-	-
33	1449	(Z)- $\beta$ -Farneseno	-	-	-	-	0,60	0,55	0,44	0,55
34	1457	$\alpha$ -Humuleno	-	0,31	-	-	0,51	0,40	-	0,22
35	1463	allo-Aromadendreno	-	-	-	-	0,14	-	-	0,24
36	1473	$\gamma$ -Muuroleno	3,03	1,95	0,69	0,61	0,86	1,13	1,41	0,74
37	1480	Germacreno D	-	0,33	-	-	0,69	0,67	-	0,57
38	1483	$\beta$ -Selineno	3,16	2,39	1,15	1,03	1,79	1,78	1,79	1,51
39	1491	Virifloreno	1,33	1,99	0,45	-	0,72	1,55	1,73	0,75
40	1497	$\alpha$ -Muuroleno	-	0,31	-	-	0,24	0,25	-	-
41	1500	Trans- $\beta$ -Guaieno	-	-	-	-	1,08	0,74	0,63	0,85
42	1503	Germacreno A	-	-	0,43	0,46	-	-	-	-
43	1505	$\alpha$ -Bulneseno	-	-	-	-	0,22	-	-	0,30
44	1511	$\beta$ -Bisaboleno	1,19	0,75	-	-	-	-	-	-
<b>45</b>	<b>1517</b>	<b><math>\gamma</math>-Cadineno</b>	<b>8,41</b>	<b>3,43</b>	<b>1,52</b>	<b>1,69</b>	<b>0,99</b>	<b>1,12</b>	<b>1,31</b>	<b>0,75</b>
46	1520	$\delta$ -Cadineno	-	0,44	-	-	0,18	0,45	0,59	-
47	1531	Cadina-1,4-dieno	-	-	-	-	0,30	-	-	0,22
48	1536	$\alpha$ -Cadineno	0,75	0,85	-	-	0,18	0,27	0,34	-
49	1541	$\alpha$ -Colacoreno	2,18	1,65	0,42	-	0,15	0,33	0,69	-
50	1565	Ledol	1,36	0,84	1,04	1,39	0,72	1,07	0,88	1,48
51	1574	Germacreno D-4-ol	-	0,38	-	-	3,37	2,22	1,08	1,20
<b>52</b>	<b>1576</b>	<b>Espatuleno</b>	<b>6,78</b>	<b>3,48</b>	<b>18,90</b>	<b>18,89</b>	<b>17,55</b>	<b>16,13</b>	<b>18,31</b>	<b>19,60</b>
<b>53</b>	<b>1582</b>	<b>Globulol</b>	<b>4,14</b>	<b>5,54</b>	<b>4,41</b>	<b>6,12</b>	<b>14,85</b>	<b>12,23</b>	<b>11,22</b>	<b>13,32</b>
<b>54</b>	<b>1590</b>	<b>Veridifloral</b>	<b>2,86</b>	<b>1,26</b>	<b>2,44</b>	<b>3,03</b>	<b>1,86</b>	<b>2,71</b>	<b>2,35</b>	<b>3,42</b>

**Tabela 3.** continuação

Nº	IK <sup>1</sup>	Componente	Área % em tratamentos * deficientes em NPK				Área % em tratamentos * suplementados em NPK			
			CC1	CL1	CC2	CL2	3C1	3L1	3C2	3L2
55	1612	1,10-Di- <i>epi</i> -cubenol	0,86	0,81	1,98	1,88	-	-	1,70	1,57
56	1642	<i>epi</i> - $\alpha$ -Cadinol	1,25	1,05	2,19	2,18	2,40	2,39	4,14	3,33
57	1647	Cubenol	0,63	0,68	1,04	0,91	0,67	0,72	1,18	0,93
<b>58</b>	<b>1654</b>	<b><math>\alpha</math>-Cadinol</b>	<b>4,20</b>	<b>2,81</b>	<b>7,13</b>	<b>5,31</b>	<b>5,77</b>	<b>4,17</b>	<b>6,85</b>	<b>6,03</b>
59	1989	Óxido de Manoil	1,15	1,11	1,27	1,21	0,76	0,77	1,09	0,70
<b>60</b>	<b>2052</b>	<b>Abietatrieno</b>	<b>2,08</b>	<b>4,29</b>	<b>4,95</b>	<b>3,86</b>	<b>1,57</b>	<b>3,04</b>	<b>1,95</b>	<b>1,47</b>
61	2102	Abietadieno	-	-	-	-	0,19	-	-	-
62	2297	Abieta-7,13-dieno-3-ona	-	0,61	0,65	0,79	0,11	0,26	0,40	0,24
63	2340	4- <i>epi</i> -Abietol	2,50	1,85	2,19	1,84	0,21	0,64	0,61	0,35
<b>64</b>	<b>2354</b>	<b>Desidroabietol</b>	<b>7,00</b>	<b>6,94</b>	<b>16,80</b>	<b>14,55</b>	<b>2,23</b>	<b>7,99</b>	<b>7,77</b>	<b>4,95</b>
<b>65</b>	<b>2391</b>	<b>Abietol</b>	<b>3,12</b>	<b>4,31</b>	<b>3,20</b>	<b>8,82</b>	<b>0,61</b>	<b>0,63</b>	<b>1,54</b>	<b>1,03</b>
Total identificado (%)			76,43	71,82	77,19	79,53	81,38	80,84	81,88	81,57

<sup>1</sup> Índice de Kovats experimental. - Composto não detectado; \* Os significados das siglas CC1, CL1, CC2, CL2, 3C1, 3L1, 3C2 e 3L2 encontram-se na Tabela 1.

(após 60 dias do plantio) e cultivadas no grupo deficiente em NPK (26,97% para CC1 e 23,99% para CL1), independente do fotoperíodo. Ainda na primeira colheita e sob fotoperíodo natural de Alfenas, os sesquiterpenos não oxigenados foram mais abundantes na amostra do grupo deficiente em NPK (26,97% para CC1). Os sesquiterpenos oxigenados foram os componentes majoritários em 6 amostras, com percentuais variando entre 39,14 e 50,88% nas amostras CC2, CL2, 3C1, 3L1, 3C2 e 3L2, sendo que nas amostras de plantas cultivadas no grupo deficiente, colhidas na primeira época de colheita e independente do fotoperíodo (CC1 e CL1), este grupo de terpenóides apresentou concentrações estatisticamente semelhantes às dos sesquiterpenos não oxigenados e diterpenos oxigenados. Desta forma, nestas 2 amostras não podemos distinguir uma classe majoritária entre sesquiterpenos não oxigenados, oxigenados e diterpenos oxigenados (Tabela 4). Os sesquiterpenos oxigenados foram os principais constituintes na maioria das populações de plantas de *H. suaveolens* do Cerrado Brasileiro<sup>9</sup> e em uma das amostras analisadas por Oliveira e colaboradores<sup>10</sup>, também do Cerrado Brasileiro. Ambos os estudos relataram a produção de sesquiterpenos principalmente por plantas encontradas em latitudes e altitudes baixas (LS 14° 30'; 524 m), contrastando com o observado no presente trabalho, onde os

sesquiterpenos foram abundantes em todas as amostras, em latitude e altitude altas (LS 21° 27'; 880 m) quando comparadas com o estudo anterior. Assim como as concentrações dos monoterpenos oxigenados (variando entre 0,00 e 4,22%), os monoterpenos não oxigenados (variando entre 2,92 e 10,35%) não sofreram fortes alterações entre as amostras (Tabela 4). Apenas na amostra de plantas colhidas na primeira época de colheita, cultivadas no grupo deficiente e fotoperíodo longo, houve acréscimo na proporção dos monoterpenos não oxigenados (10,35% para CL1). Em contraste com estudos feitos em El Salvador<sup>11</sup> e no Cerrado Brasileiro<sup>9,10</sup>, os monoterpenos tiveram baixa representatividade na composição do óleo essencial de *H. suaveolens*, e este baixo acúmulo ocorreu em uma localidade de latitude e altitude altas, independente das condições de cultivo. Novamente estes resultados contrariam os estudos realizados com plantas nativas do Cerrado Brasileiro<sup>9,10</sup>, onde monoterpenos foram produzidos principalmente em altas latitudes e altitudes.

Através dos dados apresentados nas Tabelas 5, 6 e 7 podem ser verificadas as relações existentes entre os fatores ambientais analisados e as concentrações dos principais constituintes do óleo essencial de *H. suaveolens*. O sesquiterpeno espatulenol foi o composto mais sensível às variações nas condições de cultivo e colheita das

**Tabela 4.** Porcentagem dos grupos de metabólicos especiais do óleo essencial de *H. suaveolens* obtido de plantas cultivadas em diferentes tratamentos

Grupo de metabólicos especiais	% em tratamentos deficientes em NPK				% em tratamentos suplementados em NPK			
	CC1	CL1	CC2	CL2	3C1	3L1	3C2	3L2
Álcoois alifáticos	0,78 <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	0,18 <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>
Cetona aromática	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	0,63 <sup>a</sup>	0,32 <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	0,69 <sup>a</sup>
Monoterpenos não oxigenados	7,00 <sup>ab</sup>	10,35 <sup>a</sup>	2,92 <sup>b</sup>	3,65 <sup>b</sup>	6,27 <sup>ab</sup>	4,99 <sup>ab</sup>	5,13 <sup>ab</sup>	5,11 <sup>ab</sup>
Monoterpenos oxigenados	3,76 <sup>a</sup>	1,53 <sup>a</sup>	0,13 <sup>a</sup>	- <sup>b</sup>	4,22 <sup>a</sup>	2,22 <sup>a</sup>	0,89 <sup>a</sup>	3,21 <sup>a</sup>
Sesquiterpenos não oxigenados	*26,97 <sup>a</sup>	*23,99 <sup>ab</sup>	5,96 <sup>dc</sup>	5,11 <sup>c</sup>	17,23 <sup>bc</sup>	18,35 <sup>abc</sup>	14,79 <sup>cd</sup>	12,94 <sup>cde</sup>
Sesquiterpenos oxigenados	*22,07 <sup>b</sup>	*16,85 <sup>b</sup>	*39,14 <sup>a</sup>	*39,70 <sup>a</sup>	*47,17 <sup>a</sup>	*41,64 <sup>a</sup>	*47,71 <sup>a</sup>	*50,88 <sup>a</sup>
Diterpenos não oxigenados	2,08 <sup>a</sup>	4,29 <sup>a</sup>	4,95 <sup>a</sup>	3,86 <sup>a</sup>	1,77 <sup>a</sup>	3,04 <sup>a</sup>	1,95 <sup>a</sup>	1,47 <sup>a</sup>
Diterpenos oxigenados	*13,76 <sup>bcd</sup>	*14,82 <sup>abc</sup>	24,10 <sup>ab</sup>	27,22 <sup>a</sup>	3,92 <sup>c</sup>	10,28 <sup>cde</sup>	11,41 <sup>cd</sup>	7,27 <sup>dc</sup>
Total identificado (%)	76,43	71,82	77,19	79,53	81,38	80,84	81,88	81,57

\* Grupos de metabólitos especiais majoritários na amostra do respectivo tratamento, onde as concentrações de todos os grupos de uma mesma amostra foram submetidas ao teste  $\chi^2$ , sendo considerado significância quando  $P < 0,05$ . Concentrações dos grupos de metabólitos iguais entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ) estão representadas por mesmas letras, e concentrações diferentes ( $P < 0,05$ ) estão representadas por letras distintas. Neste caso, as concentrações de um grupo de metabólitos especiais de todas as amostras foram submetidas ao teste  $\chi^2$ . Os significados das siglas CC1, CL1, CC2, CL2, 3C1, 3L1, 3C2 e 3L2 encontram-se na Tabela 1.

plantas. Sua concentração foi maior em amostras de plantas cultivadas no grupo com NPK, colhidas na primeira época de colheita (17,55% para 3C1 e 16,13% para 3L1), independente do fotoperíodo (Tabela 5). Já na segunda época de colheita, a concentração deste sesquiterpeno oxigenado não foi sensível à deficiência de NPK. Tal fato pode ser justificado pelo aumento das concentrações em amostras de plantas colhidas na segunda época de colheita, cultivadas no grupo deficiente (18,90% para CC2 e 18,89% para CL2), novamente independente do fotoperíodo (Tabela 6). Oliveira e colaboradores<sup>10</sup> observaram uma relação significativa entre os componentes do óleo e fatores edáficos. Mas até o presente momento não existem relatos da interferência das condições de cultivo sobre a concentração de espatulenol, uma vez que os componentes afetados pelas condições edáficas foram (*E*)-cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno, *o*-cimeno, limoneno e  $\delta$ -terpineno. Em contrapartida, já foi verificada a neutralidade de fatores externos sobre as concentrações dos componentes majoritários (fenchona e fenchol) de um dos quimiotipos de El Salvador<sup>11</sup>. Reciprocamente à concentração de espatulenol, as proporções de  $\alpha$ -T-bergamoteno foram maiores em amostras de plantas colhidas na primeira época de colheita, cultivadas no grupo deficiente (5,98% para CC1 e 5,55% para CL1) (Tabela 6). Em outra planta da família Lamiaceae, *Micromeria fruticosa*, foram verificadas fortes variações sazonais na composição química do óleo essencial desta espécie, principalmente reciprocidade entre os monoterpênicos (+)-pulegona e isomentol. Estas variações foram atribuídas primariamente à condição de maturação da folha<sup>30</sup>. Em *H. suaveolens* as concentrações de  $\alpha$ -T-bergamoteno e espatulenol variaram inversamente conforme a época de colheita, independente do fotoperíodo e em uma mesma condição nutricional. Assim como em *M. fruticosa*<sup>30</sup>, fatores internos aparentam controlar a composição do óleo essencial de *H. suaveolens*. Já a concentração de desidroabietol foi maior em amostras de plantas cultivadas no grupo deficiente, colhidas na segunda época de colheita (16,80% para CC2 e 14,55% para CL2), independente do fotoperíodo (Tabela 5). O fotoperíodo não interferiu isoladamente nas concentrações dos principais componentes do óleo essencial de *H. suaveolens* (Tabela 7), apresentando apenas influências interdependentes e condicionadas à disponibilidade de NPK e às épocas de colheitas sobre as concentrações de globulol (14,85% para 3C1), desidroabietol (16,80% para CC2), abietol (8,82% para CL2) e  $\gamma$ -cadineno (8,41% para CC1) (Tabelas 5 e 6). Considerando que sob fotoperíodo natural de Alfenas as plantas estavam floridas na primeira colheita e frutificadas na segunda época de colheita e que sob fotoperíodo longo as plantas permaneceram vegetativas, independe da colheita, os resultados obtidos indicam que as fases de crescimento não interferem decisivamente na composição do óleo essencial de *H. suaveolens*, contrastando com os estudos realizados no Cerrado Brasileiro<sup>10</sup>.

## CONCLUSÕES

Foi verificada a interferência de fatores ambientais na composição química do óleo essencial de plantas de *H. suaveolens* provenientes de uma população cultivada em Alfenas. A disponibilidade de NPK revelou ser um fator importante para a composição do óleo essencial, reforçando a relação entre componentes do óleo e fatores edáficos. A idade da planta, interada com a disponibilidade nutricional, constitui o fator de variação mais significativo para a composição do óleo. Contudo, isto apenas vem acrescentar evidências de que fatores endógenos podem ser decisivos para o polimorfismo químico verificado em *H. suaveolens*.

As variáveis ambientais analisadas por si só não foram capazes de explicar as fortes diferenças relatadas na literatura, e sim foram

**Tabela 5.** Comparação entre as concentrações dos principais componentes do óleo essencial de *H. suaveolens* obtidas de amostras de plantas cultivadas sob diferentes condições nutricionais (grupo deficiente/grupo NPK)

	CC1/3C1	CL1/3L1	CC2/3C2	CL2/3L2
Espatulenol	<b>0,03</b>	<b>0,006</b>	0,75	0,98
Globulol	<b>0,02</b>	0,16	0,10	0,10
Desidro Abietol	0,09	0,98	<b>0,04</b>	<b>0,02</b>
$\alpha$ -Cadinol	0,69	0,72	0,85	0,87
Abietol	0,17	0,07	0,40	<b>0,01</b>
$\gamma$ -Cadineno	<b>0,01</b>	0,22	0,86	0,53
$\alpha$ -T-Bergamoteno	0,06	0,18	0,27	1,00

Valores de *P* em negrito são inferiores a 0,05 pelo teste  $\chi^2$  e as concentrações dos componentes foram consideradas significativamente diferentes entre as respectivas amostras. Os significados das siglas CC1, CL1, CC2, CL2, 3C1, 3L1, 3C2 e 3L2 encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 6.** Comparação entre as concentrações dos principais componentes do óleo essencial de *H. suaveolens* obtidas de amostras de plantas de diferentes épocas de colheita (colheita 1/colheita 2)

	CC1/CC2	CL1/CL2	3C1/3C2	3L1/3L2
Espatulenol	<b>0,01</b>	<b>0,002</b>	0,92	0,55
Globulol	0,95	0,99	0,43	0,85
Desidro Abietol	<b>0,04</b>	0,14	0,08	0,37
$\alpha$ -Cadinol	0,38	0,46	0,77	0,57
Abietol	0,99	0,28	0,53	0,77
$\gamma$ -Cadineno	<b>0,03</b>	0,37	0,84	0,78
$\alpha$ -T-Bergamoteno	<b>0,03</b>	<b>0,04</b>	0,54	0,36

Ver rodapé da Tabela 5.

**Tabela 7.** Comparação entre as concentrações dos principais componentes do óleo essencial de *H. suaveolens* obtidas de amostras de plantas cultivadas sob diferentes condições fotoperiódicas (fotoperíodo natural de Alfenas/fotoperíodo longo)

	CC1/CL1	CC2/CL2	3C1/3L1	3C2/3L2
Espatulenol	0,34	0,91	0,80	0,82
Globulol	0,58	0,63	0,59	0,65
Desidro Abietol	0,92	0,59	0,07	0,41
$\alpha$ -Cadinol	0,66	0,56	0,61	0,82
Abietol	0,60	0,11	0,99	0,75
$\gamma$ -Cadineno	0,17	0,95	0,93	0,70
$\alpha$ -T-Bergamoteno	0,99	0,82	0,55	0,35

Ver rodapé da Tabela 5.

capazes de contribuir para a variabilidade química do óleo essencial desta espécie. Desta forma, estas diferenças podem estar relacionadas com a constituição genética (genótipos) das populações de plantas de cada região, levando em conta a ausência de troca genética entre estas áreas. Assim, variações nos parâmetros ambientais atuam diferentemente em populações de plantas de *H. suaveolens*, sendo responsáveis por alterações mais brandas nos componentes do óleo, como verificado neste estudo.

A identificação de componentes até então não constatados no óleo essencial de *H. suaveolens*, especialmente a presença de diterpenos, inclusive em elevadas proporções, também pode estar vinculada ao genótipo fixado da linhagem das plantas cultivadas em Alfenas.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de pesquisa (L. C. A. Barbosa), Iniciação Científica (F. T. Martins) e Apoio Técnico (J. L. Pereira). À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao CNPq/FINEP pelo apoio financeiro via o projeto CTInfra. À Profa. S. R. S. Silva da UNIVIÇOSA.

## REFERÊNCIAS

- Lara, N.; *Tesis de Licenciatura*, Universidad de Guadalajara, México, 1989.
- Nass, L. L.; Valois, A. C. C.; Melo, I. S.; Valadares-Inglis, M. C.; *Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas*, Ed. Fundação MT: Rondonópolis, 2001.
- Polo, M.; Felipe, G. M.; *Rev. Brasil. Bot.* **1983**, *6*, 55.
- Wulff, R.; *Ecology* **1973**, *54*, 646.
- Azevedo, N. R.; Campos, I. F. P.; Ferreira, H. D.; Portes, T. A.; Santos, S. C.; Seraphin, J. C.; Paula, J. R.; Ferri, P. H.; *Phytochemistry* **2001**, *57*, 733.
- Menghini, A.; Mantilacci, G.; Poceschi, N.; Tatani, N.C.; *Eppos* **1996**, *7*, 435.
- Silva, A. F.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 2000; Silva, A. F.; Barbosa, L. C. A.; Silva, E. A. M.; Casali, V. W. D.; Nascimento, E. A.; *Rev. Bras. Pl. Med.* **2003**, *6*, 1.
- Sidibe, L.; Chalchat, J. C.; Garry, R. P.; Harama, M.; *J. Essent. Oil Res.* **2001**, *13*, 55.
- Azevedo, N. R.; Campos, I. F. P.; Ferreira, H. D.; Portes, T. A.; Seraphin, J. C.; Paula, J. R.; Santos, S. C.; Ferri, P. H.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2002**, *30*, 205.
- Oliveira, M. J.; Campos, I. F. P.; Oliveira, C. B. A.; Santos, M. R.; Souza, P. S.; Santos, S. C.; Seraphin, J. C.; Ferri, P. H.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2005**, *33*, 275.
- Grassi, P.; Nunez, M. J.; Varmuza, K.; Franz, C.; *Flavour Fragrance J.* **2005**, *20*, 131.
- Iwu, M. M.; Ezeugwu, C. O.; Okunji, C. O.; Sanson, D. R.; Tempesta, M. S.; *Int. J. Crude Drug Res.* **1990**, *28*, 73.
- Gottlieb, O. R.; Koketsu, M.; Magalhães, M. T.; Maia, J. G. S.; Mendes, P. H. A.; Rocha, I.; Silva, M. L.; Wilberg, V. C.; *Acta Amazônica* **1981**, *11*, 143; Luz, A. I. R.; Zoghbi, M. G. B.; Ramos, L. S.; Maia, J. G. S.; Silva, M. L.; *J. Nat. Prod.* **1984**, *47*, 745; Din, L. B.; Zakaria, Z.; Sandudin, M. W.; Brophy, J.; Toia, R. F.; *Pertanika* **1988**, *11*, 239; Mallavarapu, G. R.; Ramesh, S.; Kaul, P. N.; Bhattacharya, A. K.; Rao, B. R. R.; *J. Essent. Oil Res.* **1993**, *5*, 321; Ahmed, M.; Scora, R. W.; Ting, I. P.; *J. Essent. Oil Res.* **1994**, *6*, 571; Hac, L. V.; Khoi, T. T.; Dung, N. X.; Mardarowicz, M.; Leclercq, P. A.; *J. Essent. Oil Res.* **1996**, *8*, 315; Peerzada, N.; *Molecules* **1997**, *2*, 165; Ngassoum, M. B.; Jirovetz, L.; Buchbauer, G.; *J. Essent. Oil Res.* **1999**, *11*, 283; Asekun, O. T.; Ekundayo, O.; *J. Essent. Oil Res.* **2000**, *12*, 227.
- Brown Jr., K. S.; *Acta Amazônica* **1988**, *18*, 291; Pires, M. J. P.; Gripp, A.; *Acta Amazônica* **1988**, *18*, 61.
- Rojas, A.; Hernandez, L.; Pereda-Miranda, R.; Mata, R.; *J. Ethnopharmacol.* **1992**, *35*, 275.
- Kingston, D. G.; Rao, M. M.; Zucker, W. V.; *J. Nat. Prod.* **1979**, *42*, 496.
- Asekun, O. T.; Ekundayo, O.; Adeniyi, B. A.; *Fitoterapia* **1999**, *70*, 440; Jain, S. R.; Jain, P. R.; Jain, M. R.; *Planta Med.* **1974**, *26*, 196; Fun, C. E.; Svendsen, A.; *Flavour Fragrance J.* **1990**, *5*, 161; Kar, A.; Jain, S. R.; *Qual. Plant. Mater. Veg.* **1971**, *20*, 231.
- Qureshi, S.; Rai, M. K.; Agrawal, S. C.; *Hindustan Antibiot. Bull* **1997**, *39*, 56; Pandey, D. K.; Tripathi, N. N.; Tripathi, R. D.; Dixit, S. N.; *J. Plant Dis. Prot.* **1982**, *89*, 344; Singh, G.; Upadhyay, R. K.; Rao, G. P.; *Fitoterapia* **1992**, *63*, 462; Zollo, P. H. A.; Biyiti, L.; Tchoumboungang, F.; Menut, C.; Lamaty, G.; Bouchet, P. H.; *Flavour Fragrance J.* **1998**, *13*, 107; Singh, H. B.; Handique, A. K.; *J. Essent. Oil Res.* **1997**, *9*, 683.
- Malele, R. S.; Mutayabarwa, C. K.; Mwangi, J. W.; Thoithi, G. N.; Lopez, A. G.; Lucini, E. I.; Zygadlo, J. A.; *J. Essent. Oil Res.* **2003**, *15*, 438.
- Noegroho, S. P.; Srimulyani, M. B.; *Maj. Farm. Indones.* **1997**, *8*, 160.
- Akah, P. A.; Nwanbie, A. I.; *Fitoterapia* **1993**, *64*, 42.
- Babu, S. P. S.; Sukul, N. C.; *Environ. Ecol.* **1990**, *8*, 1118.
- Hay, R. K. M.; Svoboda, K. P. *Em Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production*; Hay, R. K. M.; Waterman, P. G., eds.; Longman Group: England, 1993, p. 5.
- Adams, R. P.; *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*, Allured Publishing Corporation: Illinois, 1995.
- Dool, H. V. D.; Kratz, P. D. J. A.; *J. Chromatogr.* **1963**, *11*, 463.
- Gomes, F. P.; *Curso de Estatística Experimental*, 3ª ed., Nobel: Piracicaba, 1990.
- Silva, S. R. S.; Demuner, A. J.; Barbosa, L. C. A.; Andrade, N. J.; Nascimento, E. A.; *Rev. Bras. Pl. Med.* **2003**, *16*, 63.
- Taiz, L.; Zeiger, E.; *Plant Physiology*, 2ª ed., Sinauer Associates: Sunderland, 1998.
- Gottlieb, O. R.; Kaplan, M. A. C.; Borin, M. R. M. B.; *Biodiversidade: um enfoque químico-biológico*, Ed. UFRJ: Rio de Janeiro, 1996.
- Dudai, N.; Ravid, U.; Putieysky, E.; Lewinsohn, E.; *Annals of Botany* **2001**, *88*, 349.