



II COLÓQUIO NACIONAL DE PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS

Vila das Caldas do Gerês
Terras de Bouro
28 e 29 de Setembro de 2007

Actas

Quantificação e caracterização do óleo essencial de *Mentha cervina* L.

Leandra Rodrigues¹, Orlanda Póvoa², Patrícia Monteiro¹, Ana Monteiro¹, Margarida Moldão Martins¹ e Ana Cristina Figueiredo³

¹Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal, anamonteiro@isa.utl.pt

²Escola Superior Agrária de Elvas, Rua de Alcamim, nº19, 7350-903 Elvas, Portugal, opovoa@esaelvas.pt

³Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências de Lisboa, DBV, Centro de Biotecnologia Vegetal, C2, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal, acsf@fc.ul.pt

Resumo

A hortelã-da-ribeira (*Mentha cervina* L.) pertence à família *Lamiaceae* e, à semelhança da maioria das espécies pertencentes a esta família, possui um elevado teor em óleo essencial, (OE) o que lhe confere valor para as indústrias alimentar e farmacêutica entre outras. Neste estudo, quantificou-se e caracterizou-se o OE de quinze populações de *M. cervina*, oriundas da região do Alentejo, na fase de floração. O OE de uma das populações de *M. cervina*, foi analisado ao longo do seu ciclo.

As análises quantitativas dos OE, obtidos por hidrodestilação, revelaram que, para a *M. cervina*, o rendimento em OE é mais elevado na fase da floração, tendo sido obtido um rendimento máximo de 4%.

Qualitativamente, a composição química do OE de *M. cervina*, determinada por GC e GC/MS, é bastante homogénea ao longo de todo o ciclo da planta. A análise de Cluster da composição percentual dos óleos essenciais demonstrou uma grande homogeneidade química entre as várias populações estudadas, sendo a pulegona (62-76%), seguida da isomentona (3-15%) e do limoneno (3-7%), os principais componentes do OE desta espécie na fase de floração.

Palavras-chave: *Lamiaceae*, hortelã-da-ribeira, composição química

Abstract

Title: Chemical characterization and quantification of the essential oil of *Mentha cervina* L.

Mentha cervina L., also known as hart's pennyroyal, is an aromatic plant that is traditionally used in the Alentejo region of Portugal to flavour recipes and for the medicinal properties of the essential oil that is produced in its glandular trichomes. Although many species of mint have already been studied, little is known about the essential oil composition of *M. cervina*.

The quantitative analyse of the essential oil obtained by hydrodistillation revealed a maximum yield of 4% at flowering. The chemical composition of *M. cervina* essential oils, analysed by GC and GC-MS, showed chemical homogeneity along the life cycle of the plant. Cluster analysis of the identified essential oil components revealed a major chemical consistency between the fifteen accessions evaluated, with pulegone (62-80%), isomenthone (3-18%) and limonene (3-7%) forming the main components of *M. cervina* essential oils, at the flowering phase.

Keywords: *Lamiaceae*, Essential oil composition, Hart's PennyRoyal

Introdução

As mentas (*Mentha* spp.) constituem um dos géneros mais populares, em particular na zona Mediterrânea, onde se encontram largamente distribuídas. Muitos dos membros deste género são cultivados como plantas ornamentais, no entanto, são os seus óleos essenciais os principais responsáveis pelo seu sucesso.

Os óleos destas espécies são bastante valorizados comercialmente como aditivos em produtos alimentares, cosméticos e farmacêuticos (Ohloff, 1994), fazendo destas espécies importantes culturas. A hortelã-pimenta (*Mentha x piperita* L.) e a hortelã-comum (*M. spicata* L. e *M. cardiaca* Baker) são as espécies mais cultivadas, devido ao teor em monoterpenos cíclicos, como o mentol e a mentona no caso da hortelã-pimenta, e a carvona no caso da hortelã-comum (Kokkini, 1991).

A hortelã-da-ribeira (*Mentha cervina* L.) é uma planta aromática, tradicionalmente usada no Alentejo na confecção de receitas culinárias. Endémica na Península Ibérica e Norte de África, em Portugal é uma planta representativa do habitat prioritário Natura 3170 “Charcos temporários Mediterrâneos” (Espírito Santo *et al.*, 2003). Devido à colheita excessiva e indiscriminada e à destruição do habitat, esta planta tem sofrido uma regressão na sua distribuição. (Póvoa *et al.*, 2004, 2006).

A composição do óleo essencial de mentas, tem sido o objecto de estudo de vários trabalhos, que incluem não só a caracterização (Lorenzo *et al.*, 2002; Agnihotri *et al.*, 2005; Zainali, 2005), como a variação da composição ao longo do ciclo vegetativo (Müller-Riebau *et al.*, 1997; Kofidis *et al.*, 2004), como também o efeito de diferentes factores no rendimento e composição (Clark & Menary, 1980; Voirin *et al.*, 1990; Court *et al.*, 1993; Farooqui *et al.*, 1999). Sobre *M. cervina*, apenas um estudo reporta a caracterização do óleo essencial de uma população espanhola (Vidaurreta *et al.*, 1992). Aqueles autores reportam a pulegona como o componente maioritário do óleo essencial e concluem que são necessários mais estudos para avaliar a variação sazonal na composição e no rendimento do OE, bem como identificar a existência de quimiotipos, visto que a existência de diferentes quimiotipos constitui uma característica comum a quase todas as espécies e híbridos do género *Mentha* (Kokkini & Vokou, 1989).

Este estudo teve como objectivo caracterizar quimicamente o óleo essencial de várias populações portuguesas de *M. cervina*, de forma a identificar possíveis quimiotipos, e avaliar a variação sazonal ao nível do rendimento e composição do óleo essencial. Com estes resultados pretende-se delinear estratégias de preservação, bem como de promoção desta espécie como cultura de interesse económico.

Material e métodos

Material vegetal. Populações de *M. cervina*, colhidas no seu habitat natural e em jardins, representativas da zona do Alentejo (Portugal). No total, 15 populações após colheita, foram mantidas em cultura, na Escola Superior Agrária de Elvas (Alentejo), de onde foram retiradas amostras da parte aérea (Quadro 1). Cada amostra é constituída por folhas e flores de, pelo menos, 15 indivíduos da população, escolhidos aleatoriamente durante a fase de floração. De forma a acompanhar o rendimento e composição do óleo essencial ao longo do ciclo vegetativo, amostras de uma das populações foram colhidas ao longo do ciclo com a periodicidade de 4 semanas.

Quantificação e caracterização dos óleos essenciais. Os óleos essenciais foram

isolados, de material seco ao ar, por hidrodestilação durante 1h, num aparelho de Clevenger. A caracterização química foi efectuada por GC e GC-MS, de acordo com Faleiro *et al.* (2005). A identidade dos compostos foi determinada por comparação dos seus índices de retenção, em relação aos dos *n*-alcanos C₈-C₂₄ e espectros de massa, com os de padrões comerciais e compostos de referência presentes em óleos existentes no laboratório e por comparação com uma biblioteca de espectros de massa desenvolvida no laboratório.

Análise estatística. A composição percentual dos óleos essenciais foi ainda utilizada na determinação da relação entre as diferentes amostras, pela análise de cluster, usando o programa NTSYS (versão 2.02, Exeter Software, Setauket, New York) (Rohlf, 1998). A correlação foi seleccionada como medida de semelhança e utilizou-se o agrupamento segundo a associação média (UPGMA) na definição dos clusters. A análise de correlação foi realizada de acordo com o descrito por Pestana e Gageiro (2000), considerando a existência de uma associação muito alta entre amostras, se o seu coeficiente de correlação estiver entre 0,9 e 1, alta, se variar entre 0,7 e 0,89, moderada entre 0,4 e 0,69, baixa, entre 0,2 e 0,3 e muito baixa se for inferior a 0,2.

Resultados

O rendimento em óleo essencial é de 2,1% no período vegetativo (Abril a Maio), aumentando significativamente com a aproximação do período reprodutivo (floração), entre Junho e Julho, com um rendimento máximo de 3,9% em plena floração. Com o final do ciclo, o conteúdo em OE diminui drasticamente. O principal composto do óleo essencial de *M. cervina* é a pulegona, que no mês de Julho atinge o valor máximo de 71%, seguida da isomentona (3-13%) e do limoneno (4-6%). No período entre Maio e Agosto, não se verificaram variações significativas dos principais componentes do OE, com excepção da isomentona que no fim do referido período duplicou a quantidade inicial (Fig. 1).

Nas populações estudadas, em plena floração, o rendimento em óleo essencial varia entre 2.6% e 3.9% (p/p). Vinte e nove compostos foram identificados, correspondendo a 87-99% dos compostos presentes (Quadro 2). Os OE apresentam como constituintes maioritários, monoterpenos oxigenados (78-86%). A pulegona é o componente em maior quantidade em todas as amostras, variando entre 62 e 77%. A isomentona é o segundo componente maioritário (entre 3 e 15%), seguido do limoneno (3 e 7%). Apenas foram encontrados 2 sesquiterpenos, sendo o óxido de β -cariofileno o mais representativo (2%). Uma terceira fracção de compostos não terpénicos, designada por “outros” no Quadro 2, apresentou um valor de aproximadamente 2% em todas as amostras estudadas.

O dendograma obtido por análise de cluster das percentagens de cada componente no óleo essencial (Fig. 2), demonstra uma grande homogeneidade química, suportada pelo elevado coeficiente de correlação entre todos os OE ($S_{corr} > 0.98$), apesar de terem diferentes proveniências.

Discussão

Na fase da floração o rendimento em óleo essencial varia entre 2,6 e 3,9% (p/p), praticamente o dobro do rendimento reportado por Vázquez Vicente (1981). Estes valores são relativamente elevados, quando comparados com outros resultados obtidos em mentas (Lorenzo *et al.*, 2002; Agnihotri *et al.*, 2005), e em outras *Lamiaceae*

(Müller-Riebau *et al.*, 1997). Os OE estudados são caracterizados por um teor elevado em pulegona, indicando que todas as populações pertencem ao quimiotipo pulegona, único até agora reportado (Vázquez Vicente, 1981). Estes resultados mostram a inexistência de polimorfismo nos óleos essenciais isolados de diferentes populações, colhidas no mesmo estado de desenvolvimento e cultivadas sob as mesmas condições edáficas e climáticas. Estes resultados indicam pouca variação química entre as populações analisadas e que se distribuem por uma área superior a 27000km². Esta uniformidade é, no entanto, contraditória com a maioria dos estudos que incluem mentas, dado que a existência de diferentes quimiotipos é uma característica do género *Mentha* e dos seus híbridos (Kokkini & Vokou, 1989).

A baixa variação química encontrada, importante para um possível aproveitamento industrial, pode ser explicada por uma falta de variabilidade genética, decorrente do processo reprodutivo, tendo em conta que esta espécie é geralmente propagada vegetativamente. Estudos para avaliar a variabilidade genética existente nesta espécie são necessários, de forma a compreender a uniformidade química numa espécie pertencente a um género caracterizado por um elevado polimorfismo químico.

Agradecimentos

Ao Programa Agro - Medida 8 - Desenvolvimento Tecnológico e Demonstração – Acção 8.1 – Desenvolvimento Experimental e Demonstração (DE&D) pelo financiamento do Projecto 522 “Conservação de Germoplasma, produção e utilização dos taxa *Mentha pulegium*, *Mentha cervina* e *Thymbra capitata*”.

Referências

- Agnihotri VK, Agarwal SG, Dhar PL, Thapa RK, Baleshwar, Kapahi BK, Saxena RK & Qazi GN. 2005. Essential oil composition of *Mentha pulegium* L. growing wild in the north-western Himalayas India. *Flavour Fragr. J.* 20, 607-610.
- Clark RJ & Menary RC. 1980. The effect of irrigation and nitrogen on the yield and composition of peppermint oil (*Mentha piperita* L.). *Aust. J. Agric. Res.* 31, 489-498.
- Court WA, Roy RC & Pocs R. 1993. Effect of harvest date on the yield and quality of the essential oil of peppermint. *Canadian J. Plant Sci.* 73, 815-824.
- Espírito Santo MD, Costa JC, Capelo J & Lousã M. 2003. Checklist dos sintaxa de Portugal – Continente e Ilhas. Associação Lusitana de Fitossociologia. Lisbon.
- Faleiro, L., Miguel, G., Gomes, S., Costa, L., Venâncio, F., Teixeira, A., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G. & Pedro, L.G. 2005. Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L.. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8162-8168.
- Farooqi AHA, Sangwan NS & Sangwan RS. 1999. Effect of different photoperiodic regimes on growth, flowering and essential oil in *Mentha* species. *Plant Growth Regul.* 29, 181-187.
- Kofidis G, Bosabalidis A & Kokkini S. 2004. Seasonal variation of essential oils in a linalool ric chemotype of *Mentha spicata* grown wild in Greece. *J. Essent. Oil Res.* 16, 469-472.
- Kokkini S. 1991. Chemical races within the genus *Mentha* L. In: Liskens HF Jackson JF, Eds. *Essential oils and waxes*. Springer-Verlag, Berlin, 63-78.
- Kokkini S. & Vokou D. 1989. *Mentha spicata* (Lamiaceae) chemotypes growing wild in

- Greece. Econ. Bot. 43,192-202.
- Lorenzo D, Paz D, Dellacassa E, Davies P, Vila R & Canigüeral S. 2002. Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. Braz. arch. biol. Technol. 45,1-6.
- Muller-Riebau FJ, Berger BM, Yegen O & Cakir C. 1997. Seasonal variations in the chemical compositions of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. J. Agric. Food Chem 45, 4821-4825.
- Ohloff G. 1994. Scent and Fragrances. Springer-Verlag, New York.
- Pestana MH. & Gageiro JN. 2000. Análise de Dados para Ciências Sociais. A complementaridade do SPSS. Edições Sílabo. Lisbon.
- Póvoa O, Marinho S, & Farinha N. 2004. Preliminary study of Hart's Pennyroyal (*Mentha cervina* L.) and Pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) ethnobotany in Alentejo southern Portugal. In: Abstracts of the 9th International Congress of Ethnobiology, Kent, University of Canterbury.
- Póvoa O, Farinha N, Marinho S, Nunes P, Godinho D, Mata F, Rodrigues L & Monteiro A. 2006. Pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) and Hart's Pennyroyal (*Mentha cervina* L.) biodiversity in Alentejo. Acta Hort. 723, 91-97.
- Rohlf FJ. 1998. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Exeter Software. Setauket. New York.
- Vázquez Vicente C. 1981. Estudio de la esencia de *Preslia cervina* Fres. (Labiadas). Tesina Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.
- Vidaurreta AB, Pérez-Alonso MJ & Negueruela V. 1992. Estudio mediante cromatografía en capa fina de algunas mentas con pulegona: *Mentha pulegium* L. Y *Mentha cervina* (L.) Fresen. Bot. Complutensis 17, 79-85.
- Voirin B, Brun N & Bayet C. 1990. Effect of day length on the monoterpene composition of leaves of *Mentha x piperita*. Phytochemistry 29:749-755.
- Zeinali H. 2005. Evaluation of oil compositions of Iranian Mints (*Mentha* spp.). J. Essent. Oil Res. 17, (2), 156-159.

Quadros e figuras

Quadro 1. Origem e código de Herbário das populações de *Mentha cervina* estudadas

Código	Origem	Geo-referência		Código de Herbário
MC2	Mértola	W7.4996	N37.6773	104/2007-MC
MC7	Santiago do Cacém	W8.6813	N37.8072	106/2007-MC
MC10	Campo Maior	W7.0007	N39.0819	107/2007-MC
MC12	Nisa	W7.6811	N39.6017	108/2007-MC
MC13	Ponte de Sôr	W7.9813	N39.3361	109/2007-MC
MC14	Montargil	W7.9901	N39.3329	110/2007-MC
MC15	Redondo	W7.9680	N38.7928	111/2007-MC
MC16	Reguengos de Monsaraz	W7.4973	N38.4602	112/2007-MC
MC17	Amareleja	W7.2128	N38.1058	113/2007-MC
MC18	Serpa	W7.6001	N37.9466	114/2007-MC
MC19	Portel	W7.7986	N38.2683	115/2007-MC
MC21	Évora	W7.8919	N38.5766	116/2007-MC
MC22	Monforte	W7.4354	N39.0543	117/2007-MC
MC24	Grândola	W8.4880	N38.1336	118/2007-MC
MC29	Elvas	W7.1715	N38.7767	119/2007-MC

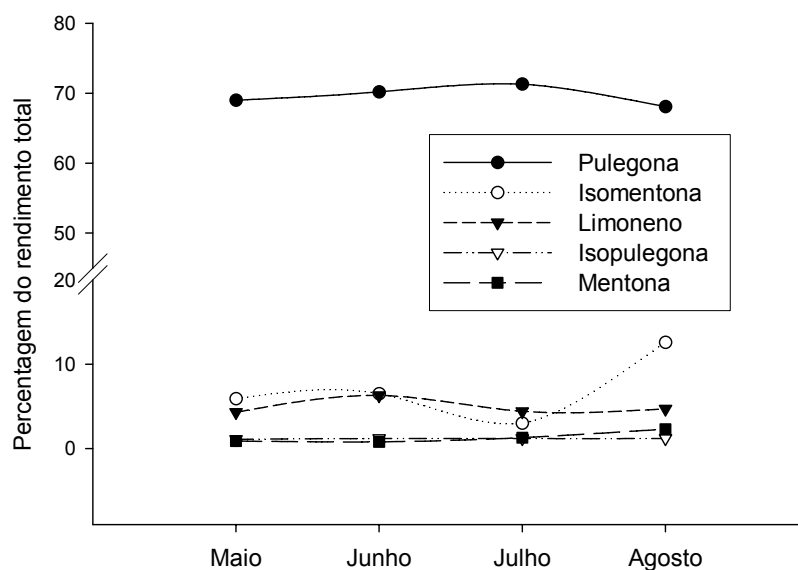


Figura 1. Evolução dos principais componentes do óleo essencial de *M. cervina* (%) ao longo do ciclo vegetativo

Quadro 2. Composição percentual do óleo essencial isolado, na fase de floração (Julho), das várias populações de *M. cervina* em cultura (ver Quadro 1). v: vestigial (<0,05%)

Componentes	Populações														
	MC 2	MC 7	MC 10	MC 12	MC 13	MC 14	MC 15	MC 16	MC 17	MC 18	MC 19	MC 21	MC 22	MC 24	MC 29
3-Metil-ciclo-hexanona	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
α -Tujeno	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	0,1	v
α -Pino	1,3	1,0	0,6	1,0	0,7	0,8	0,9	0,8	0,7	0,7	0,8	1,1	0,8	0,9	0,9
Canfeno	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	0,1	0,1	0,1
Sabineno	v	0,1	v	0,1	v	v	v	v	v	v	v	0,1	0,2	0,2	0,1
β -Pino	1,1	1,0	0,6	0,9	0,7	0,7	0,8	0,7	0,7	0,6	0,7	1,0	0,7	0,7	0,7
2,5-Dimetil-1-hexeno	0,1	0,1	0,2	v	0,1	0,3	v	v	0,2	0,1	0,7	0,1	0,3	0,3	0,3
3-Octanol	0,1	1,7	0,6	2,1	2,1	1,2	1,8	1,8	1,2	1,1	0,8	1,8	0,2	0,7	1,2
Mirceno	v	0,2	0,4	0,2	v	0,1	0,1	v	v	0,1	v	0,3	0,4	1,0	0,2
<i>p</i> -Cimeno	v	v	0,1	0,1	v	v	v	v	v	v	v	v	0,2	v	v
1,8-Cineole	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	0,1	v	v
Limoneno	6,7	5,1	5,2	4,6	3,4	5,2	5,2	4,1	5,9	5,0	5,7	6,2	7,4	6,7	6,6
<i>cis</i> - β -Ocimeno	v	v	0,1	v	v	v	v	v	v	v	v	0,2	0,4	v	v
<i>trans</i> - β -Ocimeno	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	0,1	v
γ -Terpineno	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	0,1	v	0,1	0,1
<i>n</i> - Octanol	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
Óxido de <i>cis</i> -linalol	0,1	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	0,1
Óxido de <i>trans</i> -limoneno	v	0,3	0,2	0,3	v	v	v	0,2	0,2	0,2	0,3	0,1	0,1	0,2	0,2
Mentona	1,3	1,1	3,2	1,2	1,5	1,7	0,8	1,4	1,7	1,8	1,5	1,1	1,2	1,7	1,7
Isomentona	6,1	3,1	15,0	5,3	8,3	7,3	4,3	7,8	8,5	5,7	5,0	3,2	4,0	9,1	8,9
Isopulegona	2,0	1,4	1,4	1,5	1,5	1,4	1,5	1,4	1,5	1,5	1,5	1,5	1,4	1,5	1,4
Verbenona	v	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2
Mirtenol	v	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2
Pulegona	76,4	76,5	61,5	73,4	71,8	71,9	72,9	69,9	65,4	71,1	70,3	74,1	71,8	67,0	67,8
Piperitona	v	0,1	0,4	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Carvotanacetona	0,8	0,7	1,1	0,7	0,7	0,3	0,4	0,7	0,3	0,4	0,4	0,6	0,3	0,3	0,3
Piperitenona	v	0,7	v	v	0,8	v	v	0,7	v	v	v	v	v	v	0,1
Óxido de β -Cariofileno	1,1	0,5	0,5	0,5	0,7	0,6	0,7	0,7	0,4	0,4	0,4	0,5	0,6	0,8	1,2
Epóxido de humuleno	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	0,1	v	v
Grupos químicos															
Hidrocarb. monoterpênicos	9,1	7,4	7,0	6,9	4,8	6,8	7,0	5,6	7,3	6,4	7,2	9,0	10,2	9,9	8,7
Monoterpenos oxigenados	86,7	84,1	83,0	82,7	84,9	83,2	80,4	82,4	78,3	81,2	79,5	81,1	79,2	80,3	81,0
Sesquiterpenos oxigenados	1,1	0,5	0,5	0,5	0,7	0,6	0,7	0,7	0,4	0,4	0,4	0,5	0,7	0,8	1,2
Outros	0,2	1,8	0,8	2,1	2,2	1,5	1,8	1,8	1,4	1,2	1,5	1,9	0,5	1,0	1,5
% Identificação	97,1	93,8	91,3	92,2	92,6	92,1	89,9	90,5	87,4	89,2	88,6	92,5	90,6	92,0	92,4

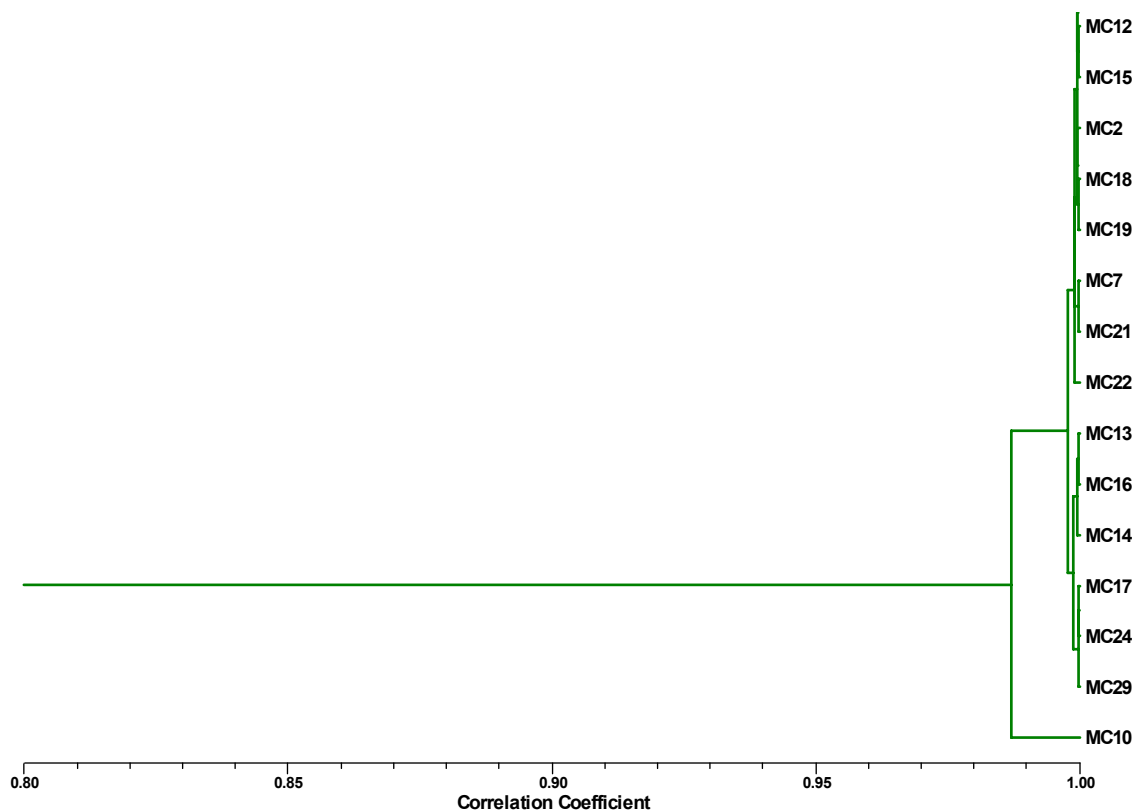


Figura 2. Dendrograma representativo do agrupamento da percentagem relativa dos componentes no óleo essencial, calculado o coeficiente de correlação e aplicado o método UPGMA.