

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**VARIABILIDADE SAZONAL, ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA, FRACIONAMENTO BIO-
GUIADO, ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO
ESTRUTURAL DOS PRINCIPAIS CONSTITUINTES
DO ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA ALBA* (MILL.) N. E.
BROWN**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Francisco Maikon Corrêa de Barros

**Santa Maria, RS, Brasil
2008**

**VARIABILIDADE SAZONAL, ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA, FRACIONAMENTO BIO-GUIADO,
ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS
PRINCIPAIS CONSTITUINTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE
LIPPIA ALBA (MILL.) N. E. BROWN**

por

Francisco Maikon Corrêa de Barros

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em
Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade
Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do
grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Berta Maria Heinzmann

Santa Maria, RS, Brasil

2008

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**VARIABILIDADE SAZONAL, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA,
FRACIONAMENTO BIO-GUIADO, ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO
ESTRUTURAL DOS PRINCIPAIS CONSTITUINTES DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Lippia alba* (MILL.) N. E. BROWN**

elaborada por
Francisco Maikon Corrêa de Barros

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Berta Maria Heinzmann, Dr^a.
(Presidente/Orientador)

Marilise Escobar Burger, Dr^a. (UFSM)

Rosemari Hörner, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 02 de junho de 2008.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ruth e Francisco, por todo amor, carinho, estímulo, compreensão e exemplo de vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo zelo com que guia meus passos.

À minha querida família, pelo apoio, incentivo e suporte prestados durante toda a minha vida, sem o qual este trabalho e demais conquistas jamais seriam realizados.

À Prof^a. Dr^a. Berta Maria Heinzmann, meu agradecimento e admiração pelo exemplo de excelente orientadora e, principalmente, pela sua contribuição na minha formação científica.

Ao Prof. Dr. Sydney Hartz Alves e a Me. Patrícia Pozzatti, do Laboratório de Pesquisas Micológicas da UFSM, pela realização dos testes de atividade antimicrobiana.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann, do Laboratório de Análises Micotoxicológicas da UFSM, pela realização dos espectros de massas e análises por cromatografia gasosa.

Ao Dr. Gilberto Dolejal Zanetti, do Departamento de Farmácia Industrial da UFSM, pela identificação do material vegetal.

À CAPES, pelo apoio financeiro fornecido através da bolsa de estudos.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo aprendizado, disponibilidade e atenção.

Ao colega e aluno de iniciação científica Eduardo de Oliveira Zambarda pela colaboração com o trabalho experimental no Laboratório de Fitoquímica.

A colega Danielle Fontana Pereira, pela amizade, carinho e os momentos de superação.

Aos colegas de laboratório, Tarcísio de Camargo, Glória N. da Silva, Chana M. da Silva, Ricardo B. Zanon, Leandro Francescato, Danielle F. Pereira, Anelise Murari, Aline A. Bolzan, Ticiane Boschetti, Mariene dos Santos, Janaína Malhke, Michel Mansur, Clarissa G. Heldwein, Fernanda H. Carvalho, Viviane de O. Garcia, Lenise de L. Silva, Simone Benovit pelos momentos de intenso trabalho, amizade e descontração.

Aos demais colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos momentos de aprendizado, convívio e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Farmácia Industrial pela ajuda e atenção.

À minha noiva Fernanda P. Machado, pelo amor, companheirismo, incentivo, paciência e compreensão.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, participaram e colaboraram para a realização deste trabalho, muito obrigado.

“A VIDA É UMA PLANTA POR CUIDAR”
(Vinícius Brum e Mauro Ferreira)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

VARIABILIDADE SAZONAL, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, FRACIONAMENTO BIO-GUIADO, ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS PRINCIPAIS CONSTITUINTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* (MILL.) N. E. BROWN

AUTOR: FRANCISCO MAIKON CORRÊA DE BARROS

ORIENTADORA: BERTA MARIA HEINZMANN

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 02 de junho de 2008.

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown é uma planta medicinal nativa da América do Sul. Conhecida popularmente como “falsa-melissa”, suas folhas e raízes são empregadas no tratamento de várias doenças, incluindo algumas de etiologia infecciosa. A presença dos óleos essenciais, entre outros metabólitos com reconhecida atividade antimicrobiana, pode explicar o seu uso como medicinal. Este trabalho descreve a análise química e a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Lippia alba* nas diferentes estações do ano, bem como o fracionamento bio-guiado, o isolamento e a elucidação estrutural dos seus principais constituintes. *Lippia alba* foi cultivada no município de São Luiz Gonzaga, RS, Brasil, e suas partes aéreas foram coletadas no período médio de cada estação (janeiro, abril, julho e outubro) durante o ano de 2005 e 2006. Material testemunha (SMDB n° 10.050) encontra-se depositado no Herbário do Departamento de Biologia da UFSM. Para a realização dos experimentos, foram utilizadas as folhas frescas. A extração dos óleos essenciais foi realizada pelo método da hidrodestilação. Os óleos foram analisados por CG-EM e seus constituintes identificados pela comparação dos índices de retenção de Kovats e espectros de massas com dados da literatura. O óleo essencial também foi fracionado por CC sobre gel de sílica até o isolamento do germacreno D-4-ol e do linalol, ambos identificados por CG-EM, RMN ¹³C e ¹H, DEPT-135, COSY e HETCOR. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, das frações e das substâncias isoladas foi determinada pelo método de microdiluição em caldo. O óleo essencial apresentou variabilidade qualitativa e semi-quantitativa em relação às estações do ano. O rendimento variou na ordem de 0,3 a 0,6%, sendo menor no inverno, e maior no verão, outono e primavera. O óleo essencial foi composto de monoterpenóides (69 - 84%) e sesquiterpenóides (6 - 24%), sendo a maioria deles oxigenados e hidrocarbonados, respectivamente. Os compostos majoritários (>15%) não foram os mesmos entre os diferentes anos de análise. A variabilidade sazonal, por sua vez, influenciou a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. Com exceção de *P. aeruginosa*, todos os outros microorganismos foram sensíveis ao óleo essencial de pelo menos uma estação. Os microorganismos com menor CIM foram *S. cerevisiae* (CIM e CFM de 800 µg/mL para o óleo obtido em janeiro), *S. aureus* (CIM de 800 µg/mL e CBM 1600 µg/mL para os óleos obtidos em abril e julho) e *K. pneumoniae* (CIM e CBM de 1600 µg/mL para o óleo extraído em julho). Tendo em vista a atividade antimicrobiana, o inverno e o verão constituem as melhores épocas para a coleta e extração dos óleos essenciais. O fracionamento bio-guiado do óleo essencial mostrou que frações contendo maiores quantidades de compostos oxigenados são mais ativas do que aquelas contendo compostos hidrocarbonados. Germacreno D-4-ol apresentou atividade contra *S. cerevisiae* (CIM e CFM de 200 µg/mL), *P. zopfii* (CIM e CFM de 400 µg/mL) e *S. aureus* (CIM e CBM de 800 µg/mL), ao passo que linalol foi inativo contra os microorganismos testados até a concentração de 3200 µg/mL.

Palavras-chave: *Lippia alba*, Verbenaceae, óleos essenciais, variabilidade sazonal, atividade antimicrobiana, fracionamento bio-guiado, germacreno D-4-ol, linalol.

ABSTRACT

SEASONAL VARIABILITY, ANTIMICROBIAL ACTIVITY, BIO-GUIDED FRACTIONATION, ISOLATION AND STRUCTURAL ELUCIDATION OF THE MAIN CONSTITUENTS OF THE ESSENTIAL OIL OF *Lippia alba* (MILL.) N. E. BROWN

AUTHOR: FRANCISCO MAIKON CORRÊA DE BARROS

ADVISOR: BERTA MARIA HEINZMANN

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown is a native medicinal plant of South America. Known popularly as “false-melissa”, its leaves and roots are used in the treatment of some illnesses, including some of infective etiology. The presence of essential oils, among other metabolites with recognized antimicrobial activity, can explain its medicinal use. This paper describes the chemical analyses and antimicrobial activity of the essential oils from *Lippia alba* at different seasons of the year, as well as the bio-guided fractionation, the isolation and the structure elucidation of its main constituents. *Lippia alba* was cultivated in São Luiz Gonzaga, RS, Brazil, and its leaves were collected in 2005 and 2006 in the middle period (January, April, July and October) of each season. A voucher specimen (SMDB n° 10.050) was deposited in the herbarium of the Department of Biology, UFSM. The extraction of the essential oils was performed by the hydrodistillation method of fresh leaves. The oils were analyzed by GC-MS and their constituents were identified by the comparison of Kovat’s retention indexes and mass spectra with literature data. The essential oil was fractionated by CC over silica gel for the isolation of germacrene D-4-ol and linalool, both identified by GC-MS, ¹³C and ¹H NMR, DEPT-135, COSY and HETCOR. The antimicrobial activity of the essential oils, fractions and isolated compounds were determined by the broth microdilution method. The essential oil showed qualitative and semi-quantitative variability in relation to the seasons of the year. The yield ranged from 0.3 to 0.6%, being lower in winter and higher in summer, autumn and spring. The essential oil was composed of monoterpenoids (69 - 84%) and sesquiterpenoids (6 - 24%), being most of them oxygenated and hydrocarbonated, respectively. Moreover, the major compounds (> 15%) were not the same between the years of the analysis. The seasonal variability influenced the antimicrobial activity of the essential oils. With the exception of *P. aeruginosa*, all other microorganisms were susceptible to the essential oil. The most sensitive ones were *S. cerevisiae* (MIC and MFC of 800 µg/mL for the oil obtained in January), *S. aureus* (MIC of 800 µg/mL and MBC of 1600 µg/mL for the oils obtained in April and July) and *K. pneumoniae* (MIC and MFC of 1600 µg/mL for the oil extracted in July). In view of the antimicrobial activity, winter and summer are the best seasons for the collection and extraction of essential oils. The bio-guided fractionation of the essential oil showed that the fractions containing greater amounts of oxygenates are more active than those containing hydrocarbon compounds. Germacrene D-4-ol presented activity against *S. cerevisiae* (MIC and MFC of 200 µg/mL), *P. zopfii* (MIC and MFC of 400 µg/mL) and *S. aureus* (MIC and MBC of 800 µg/mL), while linalool was inactive against the tested microorganisms up to 3200 µg/mL.

Key words: *Lippia alba*, Verbenaceae, essential oils, seasonal variability, antimicrobial activity, bio-guided fractionation, germacrene D-4-ol, linalool.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Constituintes isolados de <i>Lippia multiflora</i>	20
FIGURA 2 - Constituintes isolados de <i>Lippia sidoides</i> . (1) acetato do ácido oleanólico, (2) metil-3,4-diidroxibenzoato, (3) lapachenol, (4) tecomaquinona I, (5) tectoquinona, (6) tectol, (7) Acetato de tectol, (8) quercetina, (9) luteolina, (10) glicoluteolina, (11) lipisidoquinona, (12) taxifolina e (13) isolariciresinol.	21
FIGURA 3 - Constituinte isolado de <i>Lippia javanica</i>	22
FIGURA 4 - Constituintes isolados de <i>Lippia dulcis</i> . (1) (+)-hernandulcina; (2) (-)- <i>epi</i> -hernandulcina.....	22
FIGURA 5 - Constituintes isolados de <i>Lippia alva</i>	23
FIGURA 6 - Constituintes isolados de <i>Lippia graveolens</i> . Iridóides – (1) ácido carioptosídico, (2) lipiosideo I (ácido 6'- <i>O-p-trans</i> -cumaroil-carioptosídico), (3) lipiosideo II (ácido 6'- <i>O-trans</i> -cafeoil-carioptosídico), (4) loganina, (5) ácido loganínico, (6) ácido 8- <i>epi</i> -loganínico, (7) carioptosideo; Secoiridóides - (8) secologanina (9) secoxiloganina (10) dimetilsecologanosideo	23
FIGURA 7 - <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Br.: a, a' – ramos floridos; b – inflorescência; c – bráctea; d – cálice; e – corola; f – gineceu; g – cálice frutífero; h – fruto; i – corte longitudinal de um mericarpo.	25
FIGURA 8 - Aspecto geral de um ramo florido de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown.....	25
FIGURA 9 - Exemplos de monoterpênóides usados na terapêutica	28
FIGURA 10 - Principais monoterpênóides descritos para o óleo essencial de <i>Lippia alba</i>	29
FIGURA 11 - Principais sesquiterpênóides descritos para o óleo essencial de <i>Lippia alba</i>	30
FIGURA 12 - Rota biossintética dos feniletanóides, fenilpropanóides e flavonóides.	31
FIGURA 13 - Representação esquemática da biossíntese dos iridóides.	35
FIGURA 14 - Espectro de massas por impacto eletrônico do germacreno D 4-ol (A, NIST 98) e do composto 1 (B).	103
FIGURA 15 - Proposta de fragmentação do germacreno D 4-ol por EM-IE em 70 eV.	104
FIGURA 16 - Espectro de massas por impacto eletrônico do linalol (A, NIST 98) e do composto 2 (B).	106
FIGURA 17 - Proposta de fragmentação do linalol por EM-IE em 70 eV.	107
FIGURA 18 - Síntese da vitamina E a partir do linalol.	116
FIGURA 19 - Espectro de RMN ¹³ C do germacreno D-4-ol (100 MHz, CDCl ₃).	141

FIGURA 20 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° do germacreno D-4-ol (100 MHz, CDCl_3)	142
FIGURA 21 - Espectro de RMN ^1H do germacreno D-4-ol (400 MHz, CDCl_3)	143
FIGURA 22 - Ampliações do espectro de RMN ^1H do germacreno D-4-ol na região de δ 4,80 a 5,30 ppm (400 MHz, CDCl_3)	144
FIGURA 23 - Ampliações do espectro de RMN ^1H do germacreno D-4-ol na região de δ 0,60 a 2,60 ppm (400 MHz, CDCl_3)	145
FIGURA 24- Espectro de RMN de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C HETCOR) do germacreno D-4-ol (400/100 MHz, CDCl_3)	146
FIGURA 25 - Espectro expandido (campo baixo) de RMN de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C HETCOR) do germacreno D-4-ol (400/100 MHz, CDCl_3)	147
FIGURA 26 - Espectro expandido (campo alto) de RMN de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C HETCOR) do germacreno D-4-ol (400/100 MHz, CDCl_3)	148
FIGURA 27 - Espectro de RMN de correlação homonuclear (^1H - ^1H COSY) do germacreno D-4-ol (400 MHz, CDCl_3)	149
FIGURA 28 - Espectro expandido de RMN de correlação homonuclear (^1H - ^1H COSY) do germacreno D-4-ol (400 MHz, CDCl_3)	150
FIGURA 29 - Espectro de RMN ^{13}C do linalol (100 MHz, CDCl_3)	151
FIGURA 30 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° do linalol (100 MHz, CDCl_3)	152
FIGURA 31 - Espectro de RMN ^1H do linalol (400 MHz, CDCl_3)	153
FIGURA 32 - Ampliações do espectro de RMN ^1H do linalol na região de δ 5,00 a 6,00 ppm (400 MHz, CDCl_3)	154
FIGURA 33 - Ampliações do espectro de RMN ^1H do linalol na região de δ 0,80 a 2,20 ppm (400 MHz, CDCl_3)	155
FIGURA 34 - Espectro de RMN de correlação heteronuclear (H-C HETCOR) do linalol (400/100 MHz, CDCl_3)	156
FIGURA 35 - Espectro expandido (campo baixo) de RMN de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C HETCOR) do linalol (400/100 MHz, CDCl_3)	157
FIGURA 36 - Espectro expandido (campo alto) de RMN de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C HETCOR) do linalol (400/100 MHz, CDCl_3)	158
FIGURA 37 - Espectro de RMN de correlação homonuclear (^1H - ^1H COSY) do linalol (400 MHz, CDCl_3)	159
FIGURA 38 - Espectro expandido (campo baixo) de RMN de correlação homonuclear (^1H - ^1H COSY) do linalol (400 MHz, CDCl_3)	160

FIGURA 39 - Espectro expandido (campo alto) de RMN de correlação homonuclear (^1H - ^1H COSY) do linalol (400 MHz, CDCl_3). 161

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Feniletanóides descritos para a espécie <i>L. alba</i>	32
TABELA 2 - Fenilpropanóides descritos para a espécie <i>L. alba</i>	32
TABELA 3 - Flavonóides descritos para a espécie <i>L. alba</i>	33
TABELA 4 - Iridóides descritos para a espécie <i>L. alba</i>	36

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ATCC – (do inglês) “American Type Culture Collection”
- CBM – concentração bactericida mínima.
- CC – cromatografia em coluna.
- CDCl_3 – clorofórmio deuterado.
- CEME – Central de Medicamentos.
- CFM – concentração fungicida mínima.
- CG-EM – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.
- CIM – concentração inibitória mínima.
- COSY - (do inglês) “correlation spectroscopy”.
- DEPT – (do inglês) “distortionless enhancement by polarization transfer”.
- ed. – Edição.
- EM – espectrometria de massas.
- EM-IE - espectrometria de massas por impacto eletrônico.
- eV – elétron Volts.
- HETCOR - (do inglês) “heteronuclear chemical shift correlation”.
- M^+ - íon molecular.
- m/z – relação massa / carga.
- MHz – mega Hertz.
- Mill. – Miller.
- NIST - (do inglês) “National Institute of Standards and Technology”.
- NMDA – N-metil-D-aspartato.
- NO – óxido nítrico.
- OMS – Organização Mundial da Saúde.
- ppm – parte(s) por milhão.
- RMN ^{13}C – ressonância magnética nuclear de carbono 13.
- RMN ^1H – ressonância magnética nuclear de hidrogênio.
- RS – Rio Grande do Sul.
- SMDB – Santa Maria Departamento de Biologia.
- SUS – Sistema Único de Saúde.
- u.m.a. – unidades de massa atômica.
- UFMS – Universidade Federal de Santa Maria.
- δ – deslocamento químico.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 <i>Lippia</i> sp	20
2.2 <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown.	24
2.2.1 Descrição botânica.....	24
2.2.2 Distribuição geográfica, dados fenológicos e ecológicos.....	26
2.2.3 Usos populares, atividades farmacológicas e aspectos agrônômicos.....	26
2.2.4 Constituintes químicos descritos para <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown.....	26
2.2.4.1 Óleos essenciais.....	26
2.2.4.1.1 Monoterpenóides	28
2.2.4.1.2 Sesquiterpenóides	29
2.2.4.2 Compostos fenólicos.....	30
2.2.4.2.1 Feniletanóides, fenilpropanóides e flavonóides.....	30
2.2.4.3 Iridóides	35
2.2.5 Toxicidade	37
3 MANUSCRITOS CIENTÍFICOS	38
3.1 Manuscrito 1: Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae)	38
3.2 Manuscrito 2: Seasonal Variability and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae).....	60
3.3 Manuscrito 3: Bio-guided fractionation of the essential oil of <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae).....	78
4 RESULTADOS ADICIONAIS	103
4.1 Análise da fragmentação do germacreno D 4-ol por EM-IE	103
4.2 Análise da fragmentação do linalol por EM-IE	106
5 DISCUSSÃO GERAL	109

6 CONCLUSÕES	117
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
8 ANEXO	134
8.1 Artigo 1: Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo <i>Lippia alba</i> N. E. Brown (Verbenaceae).....	134
8.2 Espectros de RMN do germacreno D-4-ol	141
8.3 Espectros de RMN do linalol	151

1 INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais para tratamento, cura ou prevenção de doenças remonta o desenvolvimento da civilização humana. Por milhares de anos, produtos de origem vegetal, animal e mineral foram as principais fontes de recurso terapêutico disponível ao homem. Apesar dos altos e baixos, o interesse por fonte de novos agentes químico-terapêuticos naturais continua. Os produtos naturais e seus derivados, por exemplo, representam mais de 50% de todas as drogas em uso clínico no mundo. As plantas superiores contribuem com não menos que 25% deste total. Além disso, dos 252 fármacos considerados básicos e essenciais pela OMS, 11% são exclusivamente de origem vegetal (RATES, 2001; SCHENKEL, GOSMANN, PETROVICK, 2003; GURIB-FAKIM, 2006).

A elevada diversidade química e biológica apresentada pelos compostos de origem natural favorece o desenvolvimento de novos fármacos. Apesar disso, o uso potencial das plantas é ainda pouco explorado. Segundo estimativas, o número de espécies vegetais superiores pode chegar a 500.000. Destas, apenas 15 a 17% foram investigadas quanto ao seu potencial medicinal. Em muitos casos, apenas estudos preliminares foram realizados. Sabe-se também que a identificação de produtos com possível utilização econômica ou terapêutica aumenta com a diversidade de espécies. No mundo, metade das plantas superiores ocorre nas florestas tropicais, as quais têm no Brasil o seu principal celeiro de diversidade (SOEJARTO, 1996; RATES, 2001; GUERRA, NODARI, 2003; KOEHN, CARTER, 2005).

O uso das plantas medicinais constitui a base de um sistema sofisticado de medicina tradicional (GURIB-FAKIM, 2006). De acordo com a OMS, aproximadamente 80% da população mundial utiliza a medicina tradicional para atender as suas necessidades básicas de saúde (FARNSWORTH et al., 1985). Nos países em desenvolvimento, o amplo uso da fitoterapia, entre outras práticas, está principalmente relacionado a fatores como acessibilidade e disponibilidade (WHO, 2002). Para citar um exemplo, no Brasil, enquanto 15% da população com renda mensal acima de 10 salários mínimos consome 48% do total de medicamentos do mercado, 51% da população com renda entre zero a quatro salários mínimos consome apenas 16% do total de medicamentos disponíveis (FARMAPOLIS, 2004; FARDELONE, BRANCHI, 2006). Na tentativa de reverter este quadro e garantir o acesso à saúde, políticas públicas como a que contempla a prática da fitoterapia no SUS, consequência da aprovação de uma política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos, está sendo implementada (BRASIL, 2006).

Nos últimos anos, também há um interesse crescente e renovado no uso de terapias alternativas e produtos naturais (RATES, 2001a; RATES, 2001b). Para se ter uma idéia, o crescimento do mercado mundial de fitoterápicos é estimado em 10% a 20% ao ano. Dos US\$ 300 bilhões/ano obtidos com a venda de medicamentos no mundo, cerca US\$ 20 bilhões são derivados de substâncias ativas de plantas medicinais (SOUSA, MIRANDA, 2003). Os fitoterápicos apresentam algumas vantagens, as quais podem justificar o seu uso em relação a outros fármacos, como: efeitos sinérgicos e associação de mecanismos de ação entre os vários compostos presentes no fitoterápico, menores riscos de efeitos colaterais e menor custo (YUNES, PEDROSA, CECHINEL FILHO, 2001). Nesse aspecto, enquanto a descoberta e o desenvolvimento de um novo fármaco de origem sintética envolve investimentos na ordem de 300 a 500 milhões de dólares, o desenvolvimento de um novo fitoterápico pode ser obtido a custos bem menores, na ordem de US\$ 50 milhões. Adicionalmente, o tempo pode ser dez vezes menor no último caso (YUNES, PEDROSA, CECHINEL FILHO, 2001; SOUSA, MIRANDA, 2003).

Os fitoterápicos e as plantas medicinais, entretanto, não estão livres de causar riscos à saúde dos seus usuários. Nesse sentido, a idéia de que as drogas vegetais são completamente seguras e isentas de efeitos adversos é falsa (CALIXTO, 2000). Há poucos anos, a maioria dos fitoterápicos fabricados pela indústria brasileira estava fundamentada somente no uso popular das plantas (YUNES, PEDROSA, CECHINEL FILHO, 2001), ou seja, não havia nenhuma comprovação científica ou dados conclusivos que justificassem ou validassem o seu uso (BARROS et al., 2007). Paralelamente, ao longo dos anos, inúmeros trabalhos vêm apontando a falta de qualidade das drogas vegetais e seus fitoterápicos. As adulterações, a ausência de métodos analíticos validados e a falta de marcadores químicos adequados são alguns dos fatores que contribuem para o agravamento deste quadro (FARIAS et al., 1985; MELO et al., 2004; BARA et al., 2006). Como consequência, a segurança e a eficácia dos produtos não são garantidas e as indústrias nacionais de fitoterápicos perdem em competitividade (YUNES, PEDROSA, CECHINEL FILHO, 2001). A situação, portanto, é paradoxal: as plantas medicinais brasileiras são altamente promissoras, mas são pouco conhecidas, sobre qualquer ponto de vista (SIMÕES, SCHENKEL, 2002).

Diante do crescente interesse e da necessidade de pesquisas em relação às plantas medicinais nativas, foi objetivo deste trabalho realizar um estudo fitoquímico das partes aéreas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, com especial atenção aos óleos essenciais e seus derivados mono e sesquiterpenóides, bem como avaliar a sua atividade antimicrobiana.

Os objetivos específicos incluem:

- ✓ Analisar qualitativa e semi-quantitativamente os óleos essenciais de *Lippia alba* nas diferentes estações do ano;
- ✓ Investigar a influência da variabilidade sazonal sobre a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais;
- ✓ Determinar a melhor época para a coleta e extração do óleo essencial em função da atividade antimicrobiana;
- ✓ Determinar por meio de um fracionamento bio-guiado o(s) constituinte(s) responsável(is) pela atividade antimicrobiana do óleo essencial;
- ✓ Isolar e elucidar estruturalmente o(s) principal(is) constituinte(s) presente(s) no óleo essencial;
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e da(s) substância(s) isolada(s).

Para os óleos essenciais, em geral, são descritas as atividades antimicrobiana, antiviral, anticolinesterásica, antioxidante, antiinflamatória, antinociceptiva, antitumoral, sedativa, antidepressiva, anticonvulsivante, anti-helmíntica, antiparasitária e inseticida, entre outras (HENRIQUES, SIMÕES-PIRES, APEL, 2007). Tendo em vista este amplo espectro de ações farmacológicas, os óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown e seus terpenóides constituem uma alternativa promissora na busca de novos compostos com potencial terapêutico.

Esta dissertação está organizada na forma de manuscritos e artigos científicos. Ao todo, um artigo e três manuscritos são apresentados. Cabe ressaltar que os mesmos estão formatados de acordo com os periódicos aos quais foram aceitos ou submetidos.

O item destinado a Revisão da Literatura inicia com uma breve descrição sobre o gênero *Lippia* spp., seus aspectos químico e farmacológico. Em seguida, apresenta-se a espécie estudada, *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, suas características botânicas e os principais constituintes químicos descritos. A revisão da literatura também é contemplada pelo artigo apresentado nesta dissertação. Nele, são abordados dados gerais sobre o uso popular e as atividades farmacológicas descritas para a espécie *Lippia alba*.

Os manuscritos são apresentados como parte dos resultados e, por isso, estão inseridos no item Manuscritos Científicos. Os temas centrais abordados, nesse caso, são a variabilidade sazonal, a atividade antimicrobiana e o fracionamento bio-guiado dos óleos essenciais de *Lippia alba*. Aqueles resultados que não foram abordados em sua íntegra nos manuscritos, são apresentados no item Resultados Adicionais.

Na Discussão Geral, a proposta é realizar uma ampla interpretação dos resultados obtidos, bem como correlacioná-los com os dados da literatura. Assim, questões específicas dos assuntos abordados nesta dissertação são contempladas junto aos respectivos manuscritos/artigo científicos. A dissertação é finalizada pelas Conclusões do trabalho, Referências Bibliográficas e Anexos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Lippia* spp.

O gênero *Lippia* (Verbenaceae) compreende aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores distribuídas pelos países da América do Sul, América Central e África (TERBLANCHÉ, KORNELIUS, 1996). Há divergência dos botânicos quanto ao número de espécies que formariam o gênero. Alguns autores o consideram com cerca de 400 espécies, provavelmente devido à inclusão de vários táxons com características comuns às espécies de *Lippia* (PASCUAL et al., 2001).

Em geral, as plantas pertencentes ao gênero *Lippia* são empregadas no tratamento de distúrbios gastrointestinais e respiratórios, bem como temperos. O aspecto químico e farmacológico de algumas espécies será apresentado nos parágrafos seguintes. Maiores detalhes sobre o uso tradicional, a constituição química e as atividades farmacológicas deste gênero podem ser encontrados em artigos de revisão publicados na literatura (TERBLANCHÉ, KORNELIUS, 1996; PASCUAL et al., 2001; HEINZMANN, BARROS, 2007).

Para os óleos essenciais extraídos das folhas e talos de *Lippia multiflora* Moldenke, popularmente chá da Gambia (ABENA et al., 2003), são descritos nerolidol, linalol e β -farneseno como constituintes majoritários (VALENTIN et al., 1995). Das folhas da planta também foram isolados e identificados o *n*-tritriacontano, de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{31}\text{-CH}_3$, ácido ursólico, salvigenina (5-hidroxi-6,7,4'-trimetoxiflavona) (KANKO et al., 2004) e carvacrol (KUNLE et al., 2003) (Figura 1). Quanto às atividades biológicas descritas para esta espécie destacam-se a atividade antimalárica (VALENTIN et al., 1995), antimicrobiana (BASSOLE et al., 2003; KUNLE et al., 2003; OLADIMEJI, ORAFIDIYA, OKEKE, 2004), pediculicida, escabicida (OLADIMEJI et al., 2000), analgésica e antipirética (ABENA et al., 2003).

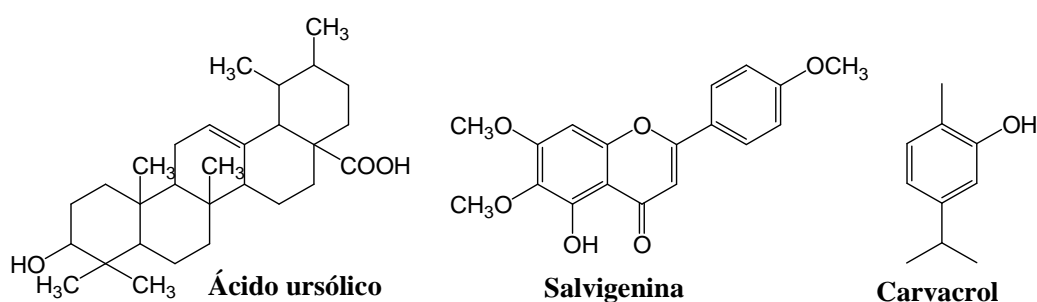


Figura 1 – Constituintes isolados de *Lippia multiflora*.

Girão et al., 2003 descreveram o timol (66,67%) como componente majoritário do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham., constituinte de reconhecida atividade antimicrobiana (WAGNER, 1993). Os autores associam, ainda, a diminuição dos distúrbios de gengiva em cachorros tratados com um preparado à base do óleo dessa planta à presença do timol (GIRÃO et al., 2003). Popularmente conhecida como alecrim-pimenta, dos talos da planta foram isolados e identificados os 13 compostos representados na figura 2 (COSTA et al., 2002). Além disso, são descritos para esta espécie a atividade antimicrobiana (OLIVEIRA et al., 2006), larvicida (CARVALHO et al., 2003) e anticolinesterásica (TREVISAN, MACHADO, 2003).

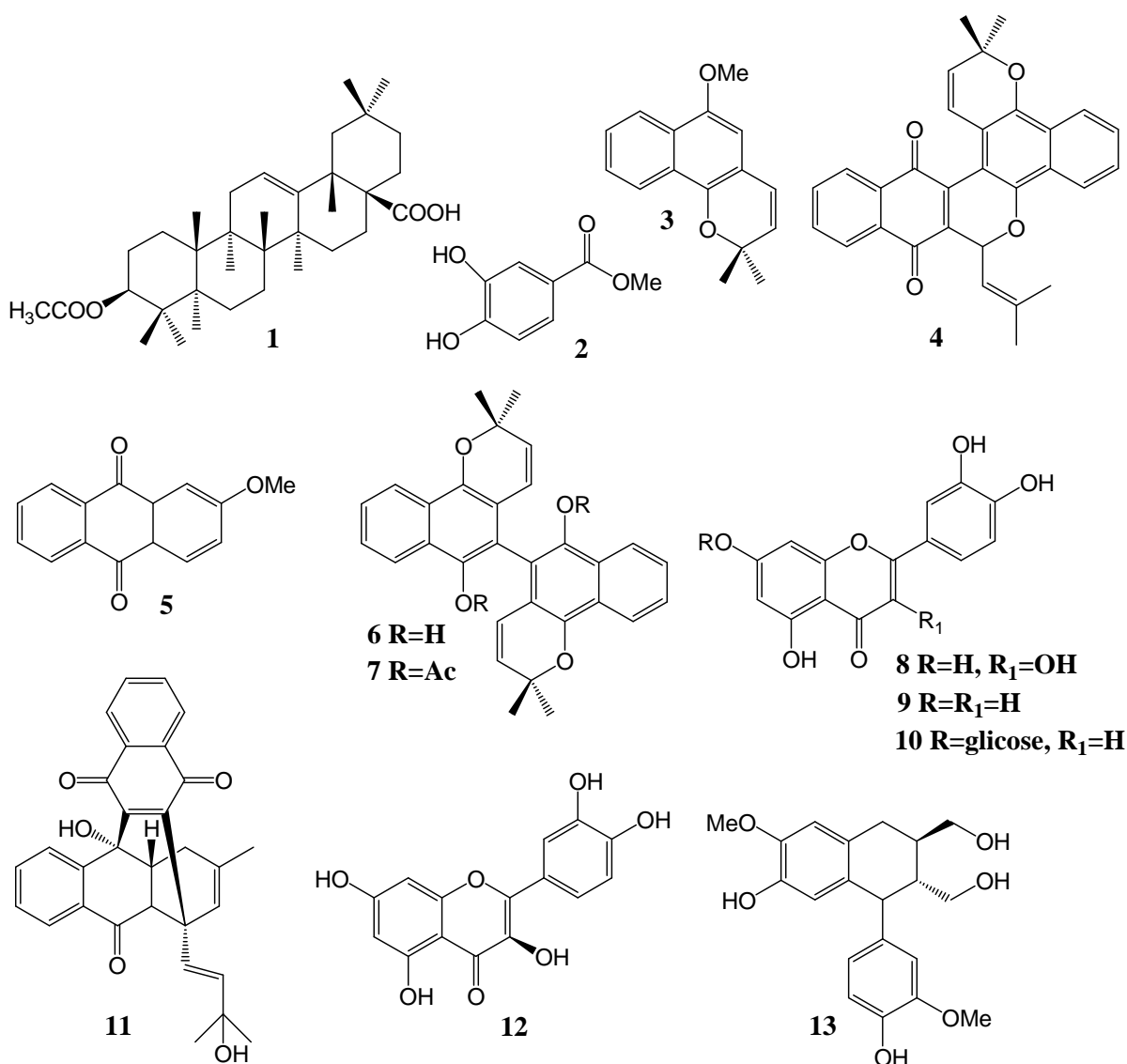


Figura 2 – Constituintes isolados de *Lippia sidoides*. (1) acetato do ácido oleanólico, (2) metil-3,4-diidroxibenzoato, (3) lapachenol, (4) tecomaquinona I, (5) tectoquinona, (6) tectol, (7) Acetato de tectol, (8) quercetina, (9) luteolina, (10) glicoluteolina, (11) lipisidoquinona, (12) taxifolina e (13) isolaricresinol.

Com base em análises de EM e RMN, o composto majoritário do óleo essencial de *Lippia javanica* (Burm. f.) Spreng, conhecida popularmente como chá da febre, foi elucidado como sendo a piperitenona (Figura 3) (MANENZHE, POTGIETER, REE, 2004). Posteriormente, foram identificados cinco quimiotipos para óleo essencial desta espécie, que incluem mirceno, carvona, piperitenona, ipsenona e linalol (VILJOEN et al., 2005). Entre as atividades biológicas descritas, destacam-se as atividades repelente (OMOLO et al., 2004) e antimicrobiana (MANENZHE, POTGIETER, REE, 2004; VILJOEN et al., 2005).

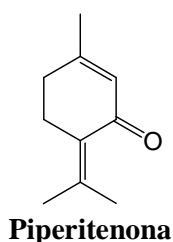


Figura 3 – Constituinte isolado de *Lippia javanica*.

A análise do óleo essencial de *Lippia dulcis* Trev., coletada e conhecida popularmente como erva doce em Porto Rico, revelou a presença de altas quantidades de sesquiterpenóides (79%). Em contrapartida, para a mesma espécie coletada no México houve o predomínio de monoterpenóides (86%) (BACHILLER et al., 1997). Das folhas e flores da espécie de Porto Rico foram isolados e identificados dois sesquiterpenóides, (+)-hernandulcina e seu epímero (-)-*epi*-hernandulcina (Figura 4).

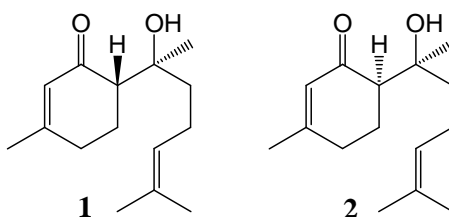


Figura 4 – Constituintes isolados de *Lippia dulcis*. (1) (+)-hernandulcina; (2) (-)-*epi*-hernandulcina.

O fracionamento bio-guiado do extrato hidrometanólico (70%) de *Lippia alva* levou ao isolamento e a identificação de três novos compostos, dois com fórmula molecular $C_{22}H_{24}O_7$ e um com fórmula $C_{21}H_{22}O_7$ (Figura 5). Estes compostos também mostraram ser inibidores do receptor 5 das quimiocinas (CCR5), um dos principais co-receptores do vírus da imunodeficiência humana (HEGDE et al., 2004).

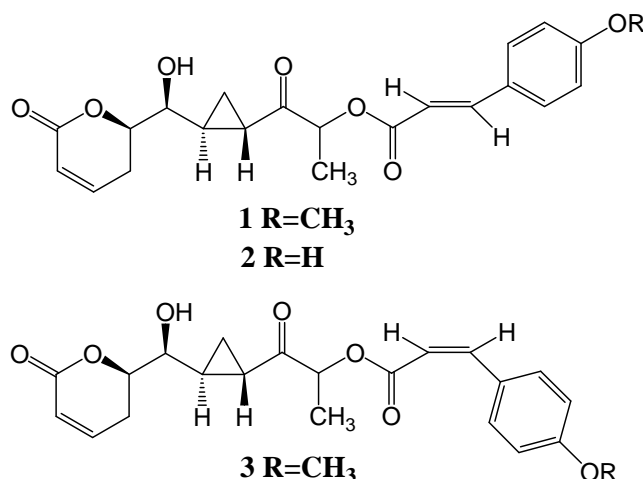


Figura 5 – Constituintes isolados de *Lippia alva*.

Das folhas de *Lippia graveolens* H.B.K., conhecida popularmente como orégano, foram isolados e identificados 7 iridóides e 3 secoiridóides glicosilados (Figura 6) (RASTRELLI et al., 1998). No México, o uso popular de *Lippia graveolens* para o tratamento de distúrbios gastrointestinais foi correlacionado às suas propriedades antimicrobianas (HERNÁNDES et al., 2003)

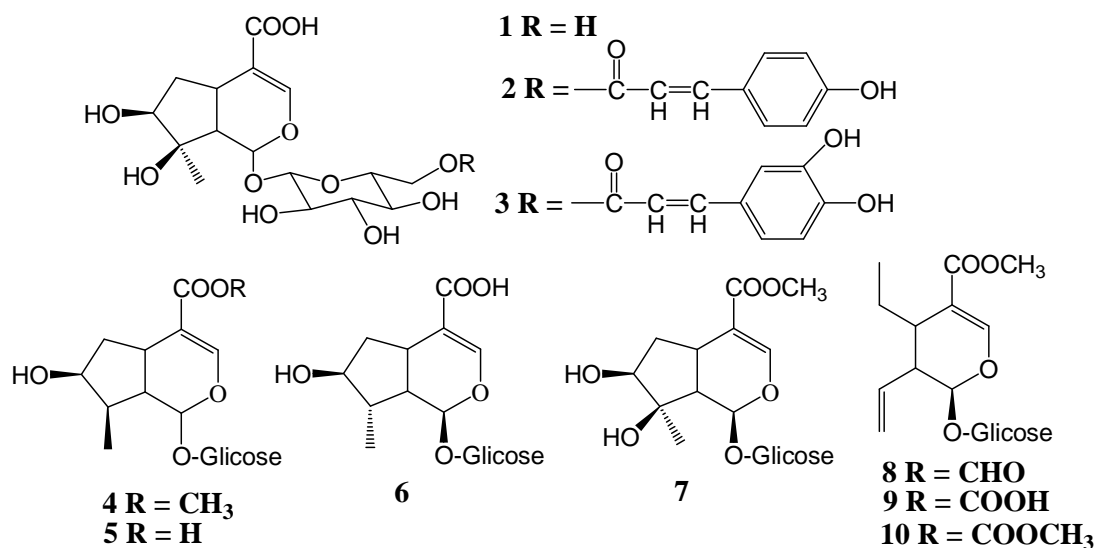


Figura 6 – Constituintes isolados de *Lippia graveolens*. Iridóides – (1) ácido carioptosídico, (2) liposídeo I (ácido 6'-*O-p-trans*-cumaroil-carioptosídico), (3) liposídeo II (ácido 6'-*O-trans*-cafeoil-carioptosídico), (4) loganina, (5) ácido loganínico, (6) ácido 8-*epi*-loganínico, (7) carioptosídeo; Secoiridóides – (8) secologanina (9) secoxiloganina (10) dimetilsecologanosídeo (Adaptado de RASTRELLI et al., 1998).

Sobre a composição dos óleos essenciais de *Lippia junelliana* (Mold.), conhecida na Argentina como *salvialora* ou *salvia morada*, dados da literatura descrevem o predomínio dos monoterpenóides (70 – 94%), seguidos pelos sesquiterpenóides (3 – 10%) e fenilpropanóides

(0,2 – 3%). Entre os componentes majoritários citam-se: mirceno, limoneno, cânfora, ocimenona, di-hidrocarvona, piperitenona e óxido de piperitenona (JULIANI Jr. et al., 2002).

A investigação de compostos fenólicos em algumas plantas aromáticas por CLAE revelou, para o extrato hidrometanólico de *Lippia triphylla*, a presença de hidroxitirosol, ácido caféico, ácido ferúlico e apigenina (PROESTOS, SERELI, KOMAITIS, 2006).

2.2 *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown

2.2.1 Descrição botânica

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown é um subarbusto decumbente, com ramos quadrangulares quando jovens. Planta aromática, que atinge até 1,70 metros de altura. As folhas patentes são simples, inteiras, membranáceas, pecioladas, pubescentes, com aroma cítrico. Ocorrem em pares decussados ou em número de três por nó. O limbo possui formato variável, em geral ovado, com ápice agudo, base cuneada e decurrente, bordo serrado (menos na base propriamente dita), tendo em média 8,3 cm de comprimento por 3,3 cm de largura. A venação é do tipo craspedódroma, com a nervura principal saliente na face dorsal. A inflorescência é axilar, pedunculada, do tipo recemosa, com flores rosa, de fauce amarela, que ocorrem em capítulos subglobulosos (BRITTON, 1965 apud CORRÊA, 1992).

Em complementação a descrição acima, BUKART, 1979 apud GOMES et al., 1993 descreve a morfologia de *Lippia alba* como:

Arbusto aromático rizomatoso, de 1-1,5 cm de altura, muito ramoso, de ramos desgados, flexíveis, eretos ou arqueados, às vezes decumbentes e arraizantes, de entrenós em geral largos; Folhas opostas ou alternas ovadas ou ovado-oblongas, de 2-6 cm de comprimento por 1,2-4,5 cm de largura, cuneadas em pecíolo curto, conspícuas e regularmente serradas, rugosas, subtriplinérvias, hirto-ásperas na face adaxial, velutino-tomentosas ou vilosas e resinosas-pontuadas na face abaxial, reticulada venosa e com nervuras marcadamente proeminentes; Inflorescências em capítulos axilares, 1 ou mais raramente 2 por axila, pubescentes, globosos (invólucro de cerca de 8 cm de diâmetro), cilindros até 2,5 cm de comprimento, brevemente pedunculados; Flores violáceas com face amarela e branca. Brácteas imbricadas, pluriseriadas, ovadas, de 5 a 6 mm de comprimento, largamente acuminadas, sericeo-pubescentes e ciliadas; Cálice 2-filo, de 1,5 a 1,7 mm de comprimento, pubescentes; Corola marcadamente zigo-morfa, de lábio inferior notavelmente desenvolvido, com lóbulo médio maior e tubo ensanchado na metade superior, pubescente exteriormente; Estames insertos na metade superior do tubo corolino, inclusos; Ovário globoso, estilete curto (1,8 mm compr.), estigma lateral; Fruto esquizocárpico subgloboso a obovóide, de 2,8-3,0 mm de diâmetro, coberto pelo cálice acrescente (BUKART, 1979 apud GOMES et al., 1993) (Figura 7).

Alguns autores consideram como sinônimos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown as seguintes denominações científicas: *L. asperifolia* A. Rich.; *L. crenata* Sessé & Moc.; *L. geminata microphylla* Griseb.; *L. germinata* H.B.K.; *L. glabriflora* Kuntze; *L. havanensis* Turcz; *L. lantanoides* Coult.; *L. trifolia* Sessé & Moc.; *Lantana alba* (H.B.K.) Spreng.;

Lantana geminata Spreng.; *Lantana lippoides* Hook & Arn.; *Phyla geminata* H.B.K.; *Verbena lantanoides* Willd. (PASCUAL et al., 2001). O aspecto geral de um ramo florido de *L. alba* pode ser observado na figura 8.

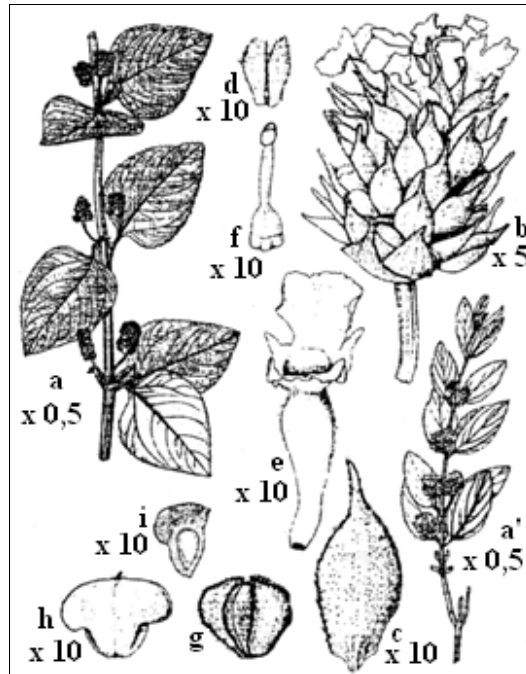


Figura 7 - *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.: a, a' – ramos floridos; b – inflorescência; c – bráctea; d – cálice; e – corola; f – gineceu; g – cálice frutífero; h – fruto; i – corte longitudinal de um mericarpo (Adaptado de BUKART, 1979 apud GOMES et al., 1993).



Figura 8 – Aspecto geral de um ramo florido de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown.

2.2.2 Distribuição geográfica, dados fenológicos e ecológicos

A espécie *Lippia alba* é amplamente distribuída na América Central e do Sul, especialmente no Brasil e norte da Argentina. A sua presença também é reportada nos EUA (Flórida e Texas), África tropical, Índia e Austrália. A planta cresce em solos arenosos, nas margens de rios, lagos e lagoas, em regiões de clima tropical, subtropical e temperado. É uma planta perene e, segundo Corrêa (1992), pode florescer o ano todo. O hábito decumbente propicia que os ramos enraízem ao entrar em contato com o solo, originando uma nova planta. Seu desenvolvimento é rápido. Além disso, é capaz de desenvolver-se em condições de solo pouco fértil e com escassez de água. É uma planta alógama auto-incompatível. Vegetativamente, a propagação pode ser feita por estaquia (CORRÊA, 1992; SINGH et al., 1999; PASCUAL, 2001; ATTI-SERAFINI et al., 2002; BIASI, COSTA, 2003; HENNEBELLE, 2006; YAMAMOTO, 2006). Também é descrita como sendo uma planta nectarífera, cujo mel apresenta coloração âmbar claro (VIT, SILVA, MELÉNDEZ, 2003).

2.2.3 Nomes e usos populares, atividades farmacológicas e aspectos agrônômicos

Dados gerais sobre os nomes e o uso popular, atividades farmacológicas e aspectos agrônômicos de *Lippia alba*, entre outros assuntos pertinentes, são apresentados no primeiro artigo desta dissertação. Tal artigo intitulado “Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo *Lippia alba* N. E. Brown (Verbenaceae)” encontra-se em anexo na página 136.

2.2.4 Constituintes químicos descritos para *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown

Quimicamente, *L. alba* caracteriza-se pela presença de óleos essenciais (mono e sesquiterpenóides), compostos fenólicos (flavonóides e feniletanóides) e iridóides. Também são reportados para esta espécie outros metabólitos como taninos, saponinas triterpênicas, resinas, mucilagens, alcalóides, esteróides e glicolipídios (PASCUAL et al, 2001; MENDES, MACHADO, FALKENBERG, 2006). Os grupos de maior importância para a espécie são abordados em maior detalhe nas seções seguintes.

2.2.4.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais podem ser definidos como uma mistura complexa de substâncias voláteis, geralmente odoríferas e líquidas (SIMÕES, SPTITZER, 2003). Apresentam comumente de 20 a 60 componentes em mistura (BAKKALI et al., 2008), sendo um, dois ou três deles majoritários em termos de porcentagem (TISSERAND, 1996). Os terpenóides e seus derivados de baixo peso molecular são os constituintes predominantes dos óleos essenciais. Tais compostos representam uma ampla classe de substâncias formada pela condensação de diferentes unidades do isopreno (C_5H_{10}). Os terpenóides mais freqüentes nos óleos essenciais são os monoterpenóides (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenóides (SANGWAN et al., 2001; SIMÕES, SPTITZER, 2003).

Entre as principais características físico-químicas dos óleos essenciais destacam-se: aparência oleosa à temperatura ambiente; volatilidade; aroma agradável e intenso, na maioria das vezes; boa solubilidade em solventes orgânicos e limitada em água (hidrolato); sabor acre e picante; geralmente incolores ou ligeiramente amarelados; instáveis na presença de ar, luz, calor, umidade e metais; a maioria opticamente ativa (SIMÕES, SPTITZER, 2003).

Podem ser encontrados em todos os órgãos vegetais (folhas, flores, frutos, raízes, rizomas, lenhos, córtex ou sementes), sendo secretados e armazenados em estruturas especializadas como pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas e canais oleíferos (SIMÕES, SPTITZER, 2003; HENRIQUES, SIMÕES-PIRES, APEL, 2007). De acordo com estudos histoquímicos, em *Lippia alba* os óleos essenciais estão presentes em todo o mesofilo, nos pêlos glandulares e nas células oclusivas dos estômatos (CORRÊA, 1992).

O papel biológico e ecológico dos óleos essenciais é bastante diversificado. De maneira geral, atuam como inibidores da germinação, na proteção contra predadores, na atração de polinizadores, bem como na proteção contra a perda de água e o aumento da temperatura (SIMÕES, SPTITZER, 2003).

Quanto aos métodos de extração, as principais técnicas empregadas são a prensagem ou expressão, a extração com solventes orgânicos ou gorduras, a extração por fluido supercrítico e a destilação por arraste de vapor d'água (SIMÕES, SPTITZER, 2003; HENRIQUES, SIMÕES-PIRES, APEL, 2007). De acordo com a literatura, este último método é o mais utilizado, uma vez que apresenta bons rendimentos, fácil execução e baixo custo (CASTRO, 1998 apud STÜKER, 2007). Convém destacar também que a hidrodestilação pode ser considerada um subtipo da destilação por arraste de vapor. A principal diferença entre a hidrodestilação e a destilação por arraste de vapor propriamente

dita está na forma como ocorre o contato da amostra com a água, ou seja, contato direto e indireto, respectivamente (CHERCHI, 1999 apud SIMIONATTO, 2004).

Atualmente, são conhecidos cerca de 3000 óleos essenciais, chegando a 300 o número daqueles comercialmente importantes (BAKKALI, et al., 2008). São empregados na indústria de alimentos como flavorizantes, de cosméticos e produtos domissanitários como perfumes, bem como na indústria farmacêutica, pelas suas propriedades farmacológicas (BURT, 2004; HENRIQUES, SIMÕES-PIRES, APEL, 2007).

2.2.4.1.1 Monoterpenóides

Os monoterpenóides (C_{10}) representam a classe dos terpenóides formada pela condensação de duas unidades de isopreno. Atualmente, são conhecidos cerca de 1000 monoterpenóides naturais, a maior parte dos quais foi isolada de plantas superiores. Além de serem os principais constituintes dos óleos essenciais, são também os de maior volatilidade, dado o baixo peso molecular que possuem (ROBBERS, SPEEDIE, TYLER, 1997; SIMÕES, SPTITZER, 2003). Nas espécies vegetais aromáticas, chegam a corresponder até 5% do peso seco da planta (CROTEAU, KUTCHAN, LEWIS, 2000). O papel biológico (GRODNITZKY, COATS, 2002) e as atividades farmacológicas descritas para este grupo de substâncias são praticamente as mesmas daquelas mencionadas para os óleos essenciais (HENRIQUES, SIMÕES-PIRES, APEL, 2007). Na terapêutica, são empregados como antipruriginosos, rubefacientes, antitussígenos, expectorantes, anestésicos locais, analgésicos, antiinflamatórios, antipiréticos e carminativos, com destaque para cânfora, eucaliptol (1,8-cineol), mentol, timol e borneol (ROBBERS, SPEEDIE, TYLER, 1997; SILVA, 2002) (Figura 9).

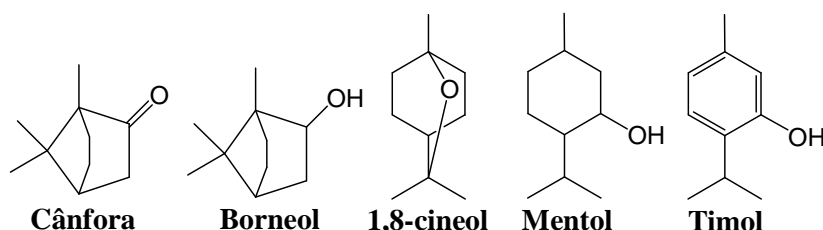


Figura 9 – Exemplos de monoterpenóides usados na terapêutica (Adaptado de: ROBBERS, SPEEDIE, TYLER, 1997; SILVA, 2002).

Os principais monoterpenóides descritos para o óleo essencial de *Lippia alba* são apresentados na figura 10.

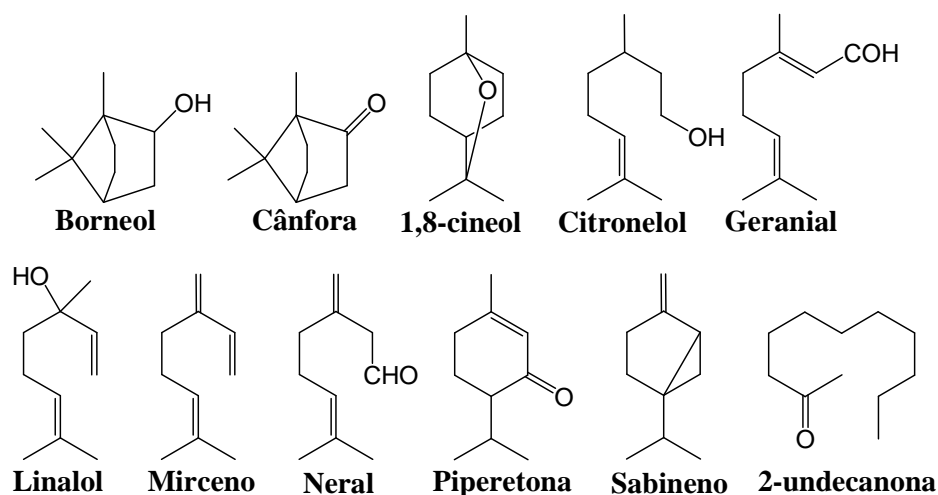


Figura 10 – Principais monoterpênóides descritos para o óleo essencial de *Lippia alba* (Adaptado de: PASCUAL et al., 2001).

2.2.4.1.2 Sesquiterpenóides

Os sesquiterpenóides (C_{15}) representam a classe dos terpenóides formada pela condensação de três unidades de isopreno. Nas plantas, apresentam uma função ecológica importante na interação com insetos e micróbios, onde atuam como atrativos, deterrentes e fitoalexinas. Estruturalmente, possuem cerca de 300 esqueletos carbônicos distintos, sendo vários deles constituintes dos óleos essenciais (ROBBERS, SPEEDIE, TYLER, 1997; CROTEAU, KUTCHAN, LEWIS, 2000; PROSSER et al., 2002; SIMÕES, SPTITZER, 2003). Da mesma forma que os monoterpênóides, vários sesquiterpenóides obtidos e testados de forma isolada têm demonstrado ser os responsáveis pelas atividades biológicas dos óleos essenciais (HENRIQUES, SIMÕES-PIRES, APEL, 2007). Em relação ao uso terapêutico, o sesquiterpenóide α -humuleno destaca-se por ser o princípio ativo de um antiinflamatório tópico considerado o primeiro fitoterápico genuinamente nacional (NATERCIA, 2005). Os principais sesquiterpenóides descritos para o óleo essencial de *Lippia alba* são apresentados na figura 11.

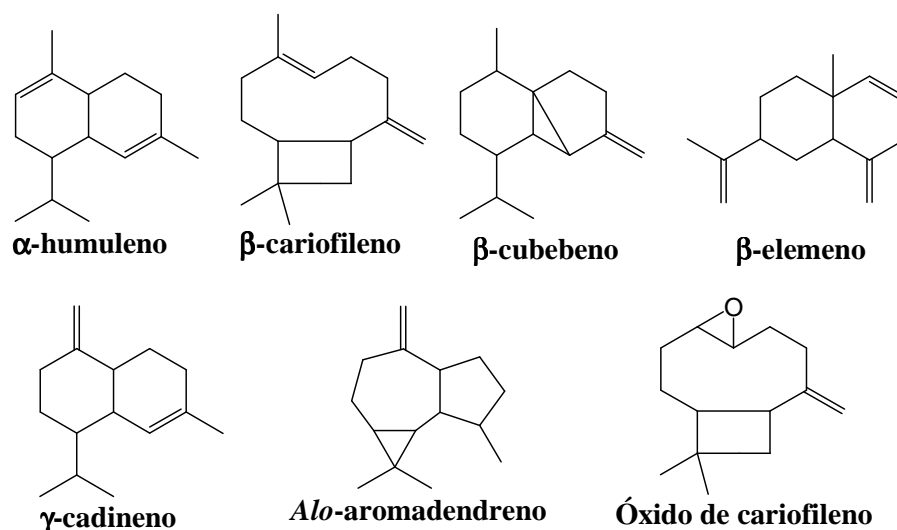


Figura 11 – Principais sesquiterpenóides descritos para o óleo essencial de *Lippia alba* (Adaptado de: PASCUAL et al., 2001).

2.2.4.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos compreendem todas aquelas substâncias que possuem pelo menos um anel aromático substituído por um grupamento hidroxila. Estão amplamente distribuídos no reino vegetal, onde normalmente são encontrados na forma de ésteres e heterosídeos. São solúveis em água e em solventes orgânicos polares. Em geral, possuem características ácidas e apresentam intensa absorção na região do ultravioleta. Contribuem para o sabor, o odor e a coloração de diversos vegetais, bem como participam na defesa das plantas e na inter-relação entre espécies. Além disso, apresentam atividade antioxidante, antimicrobiana, antiviral, entre outras (CARVALHO et al., 2003).

2.2.4.2.1 Feniletanóides, fenilpropanóides e flavonóides

Feniletanóides (C6-C2), fenilpropanóides (C6-C3) e flavonóides (C6-C3-C6) constituem os principais grupos de compostos fenólicos descritos para a espécie *Lippia alba* (BARBOSA, LIMA, SILVEIRA, 2005; BARBOSA et al., 2006; HENNEBELLE, 2006; HENNEBELLE et al., 2008). Biogeneticamente, os feniletanóides e os fenilpropanóides derivam da rota do ácido chiquímico, enquanto os flavonóides resultam de rotas biossintéticas separadas: a do ácido chiquímico e a do acetato, via ácido malônico (Figura 12) (ROBBERS, SPEEDIE, TYLER, 1997; CARVALHO et al., 2003; SANTOS, 2003; ZUANAZZI, MONTANHA, 2003).

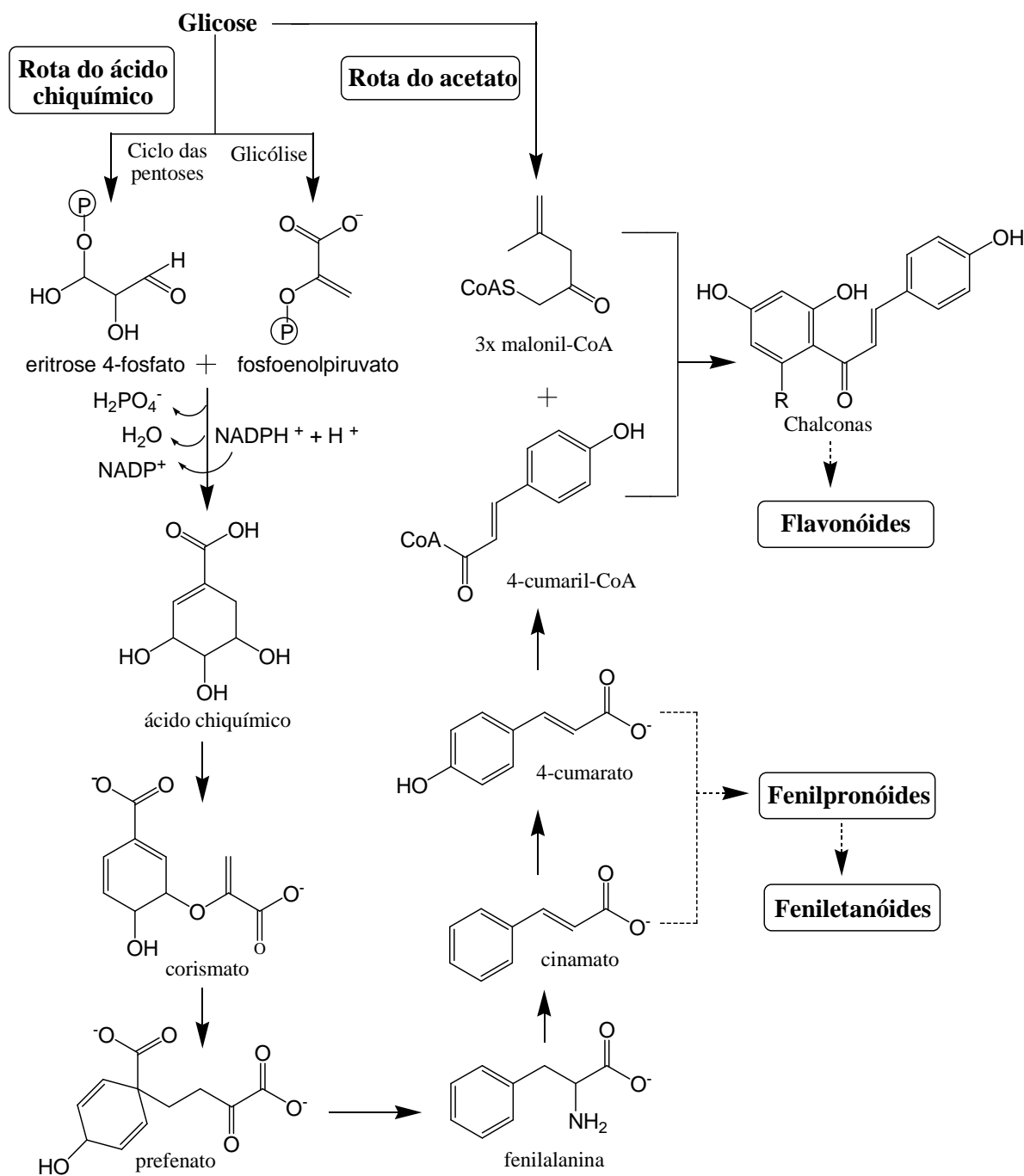


Figura 12 – Rota biossintética dos feniletanóides, fenilpropanóides e flavonóides (Adaptado de: ROBBERS, SPEEDIE, TYLER, 1997; CARVALHO et al., 2003; SANTOS, 2003; ZUANAZZI, MONTANHA, 2003).

Geralmente, os feniletanóides são obtidos como produtos da β -oxidação e descarboxilação oxidativa dos derivados fenilpropanóides (ROBBERS, SPEEDIE, TYLER, 1997; SANTOS, 2003). Adicionalmente, muitos fenilpropanóides simples ou de baixo peso molecular são isolados juntamente com os terpenóides presentes nos óleos essenciais (ROBBERS et al., 1997; SANTOS, 2003; SIMÕES, SPTITZER, 2003). Este, entretanto, não

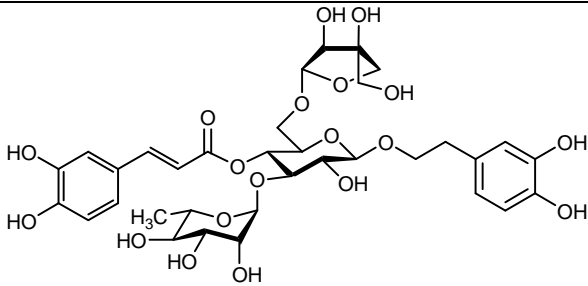
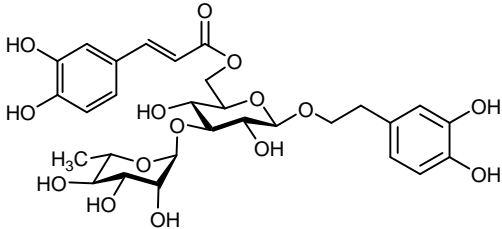
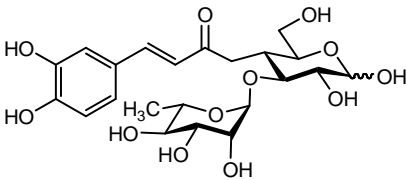
é o caso de *Lippia alba*. Os principais feniletanóides e fenilpropanóides descritos para esta espécie até o momento estão representados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Feniletanóides descritos para a espécie *L. alba*.

FENILETANÓIDES (Parte vegetal)	ESTRUTURA	REFERÊNCIA
Isonuomiosídeo (Folhas)		BARBOSA et al., 2006; HENNEBELLE, 2006; HENNEBELLE et al., 2008.
Decafeoilverbascosídeo (Folhas)		BARBOSA et al., 2006; HENNEBELLE, 2006; HENNEBELLE et al., 2008.

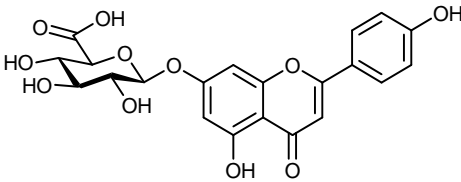
Tabela 2 – Fenilpropanóides descritos para a espécie *L. alba*.

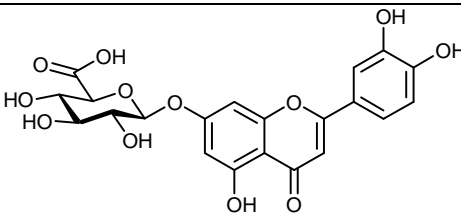
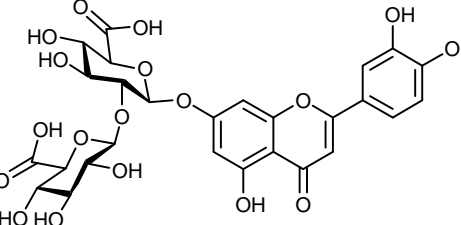
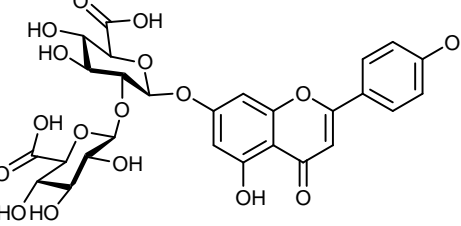
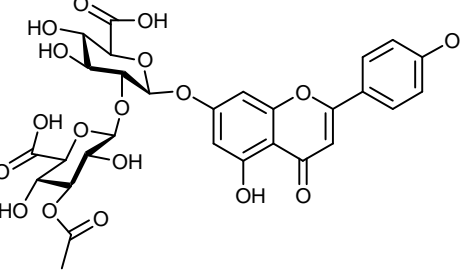
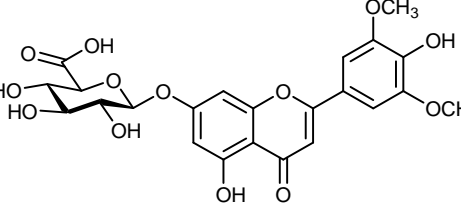
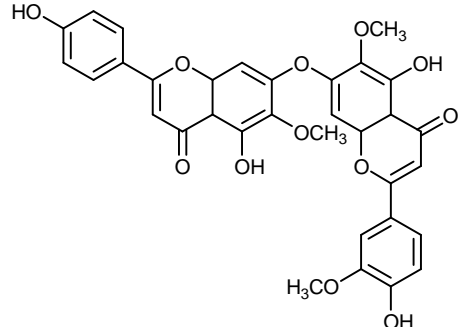
FENILPROPANÓIDES (Parte vegetal)	ESTRUTURA	REFERÊNCIA
Acteosídeo, verbascosídeo ou kusaginina (Folhas)		HENNEBELLE, 2006; HENNEBELLE et al., 2008.
2-acetilacteosídeo (Folhas)		HENNEBELLE, 2006; HENNEBELLE et al., 2008.
Calceolariosídeo E ou nuomiosídeo A (Folhas)		HENNEBELLE, 2006; HENNEBELLE et al., 2008.

Forsitosideo B (Folhas)		HENNEBELLE, 2006; HENNEBELLE et al., 2008.
Isoacteosideo ou isoverbascosideo (Folhas)		HENNEBELLE, 2006; HENNEBELLE et al., 2008.
Cistanosideo F (Folhas)		HENNEBELLE, 2006; HENNEBELLE et al., 2008.

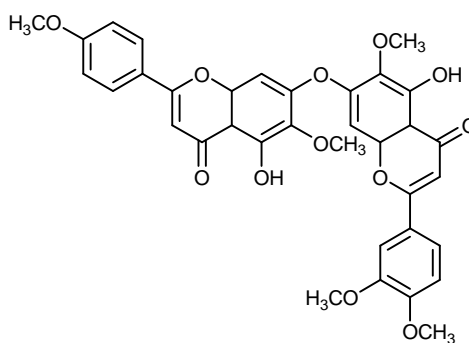
Entre os grupos fenólicos de origem natural, os flavonóides destacam-se por sua ampla distribuição e diversidade estrutural, sendo mais de 6400 estruturas conhecidas até o momento. Constituem um grupo de pigmentos e sua presença nos vegetais parece estar relacionada com funções de defesa (proteção contra raios ultravioleta, insetos, fungos, vírus e bactérias), atração de polinizadores, antioxidantes, agentes alelopáticos, reguladores de hormônios e inibidores de enzimas (HARBORNE, WILLIAMS, 2000; ZUANAZZI, MONTANHA, 2003). As atividades farmacológicas descritas para este grupo incluem atividade antiviral, antioxidante, antiinflamatória, antitumoral, tônico-venosa, hormonal, antimicrobiana, entre outras (CUSHNIE, LAMB, 2005; ZUANAZZI, MONTANHA, 2003). Os principais flavonóides descritos para a espécie *L. alba* são apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Flavonóides descritos para a espécie *L. alba*.

FLAVONÓIDES (Parte vegetal)	ESTRUTURA	REFERÊNCIA
Apigenina-7- glicoronideo (Folhas)		HENNEBELLE, 2006; HENNEBELLE et al., 2008.

Luteolina-7-glicoronideo (Folhas)		HENNEBELLE, 2006; HENNEBELLE et al., 2008.
Luteolina-7- diglicoronideo (Folhas)		HENNEBELLE, 2006; HENNEBELLE et al., 2008.
Apigenina-7- diglicoronideo (Folhas)		HENNEBELLE, 2006.
Apigenina-7- acetildiglicoronideo ou 3- acetilclerodendrina (Folhas)		HENNEBELLE, 2006; HENNEBELLE et al., 2008.
Tricina-7-glicoronideo (Folhas)		HENNEBELLE, 2006.
5,5''-di-hidroxi- 6,4',6'',3''',4''''- pentametoxi-[C ₇ -O-C ₇]- biflavona (Folhas)		BARBOSA et al., 2005; BARBOSA et al., 2006; HENNEBELLE, 2006; HENNEBELLE et al., 2008.

4',4,5,5''-tetra-hidroxi-
6,6'',3''',4'''-trimetoxi-
[C₇-O-C₇]-biflavona
(Folhas)



BARBOSA et al.,
2005;
BARBOSA et al.,
2006;
HENNEBELLE,
2006;
HENNEBELLE et
al., 2008.

2.2.4.3 Iridóides

Os iridóides constituem uma classe de metabólitos secundários encontrados em uma ampla variedade de plantas e alguns animais. Nas plantas, participam dos processos de defesa, onde usualmente ocorrem na forma glicosilada. São derivados biogénicos dos monoterpenóides e constituem estruturas de ligação na formação de outros terpenóides e alcalóides. A estrutura dos iridóides carbocíclicos consiste de um esqueleto ciclopentano-[C]-pirano. A partir dele, outros grupos de iridóides são obtidos. A clivagem oxidativa entre as ligações 7 e 8 do anel ciclopentano, por exemplo, resulta nos chamados secoiridóides (Figura 13). As etapas finais da biosíntese, por sua vez, consistem de reações de O-glicosilação ou O-alquilação (BIANCO, 1994; NANGIA, PRASUNA, RAO, 1997; SAMPAIO-SANTOS, KAPLAN, 2001; DINDA, DEBNATH, HARIGAYA, 2007).

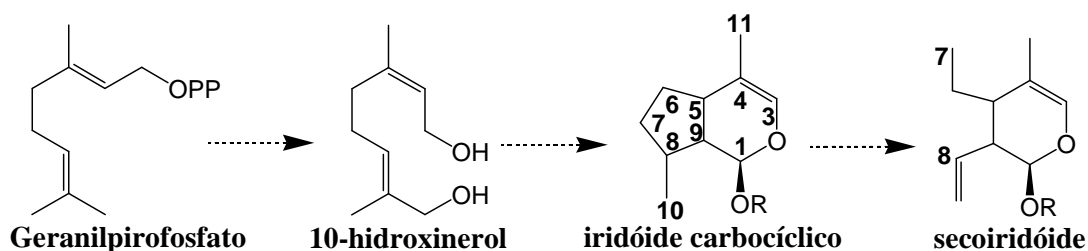


Figura 13 – Representação esquemática da biosíntese dos iridóides (Adaptado de: BIANCO, 1994; NANGIA, PRASUNA, RAO, 1997; SAMPAIO-SANTOS, KAPLAN, 2001; DINDA, DEBNATH, HARIGAYA, 2007).

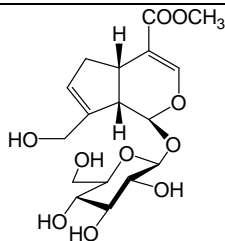
Os iridóides exibem uma ampla faixa de bioatividades como cardiovascular, hepatoprotetora, colerética, hipoglicêmica, antiinflamatória, antiespasmódica, antitumoral, antiviral, imunomoduladora e purgativa. Além disso, são úteis como marcadores taxonômicos para muitas espécies vegetais, incluindo aquelas do gênero *Lippia* (RIMPLER, SAUERBIER,

1986; SAMPAIO-SANTOS, KAPLAN, 2001; DINDA, DEBNATH, HARIGAYA, 2007). Na tabela 4 estão representados os principais iridóides descritos para a espécie *L. alba*.

Tabela 4 – Iridóides descritos para a espécie *L. alba*.

IRIDÓIDE (Parte vegetal)	ESTRUTURA	REFERÊNCIA
Éster metílico do Shanzisideo (Folhas)		BARBOSA et al., 2006; HENNEBELLE, 2006; HENNEBELLE et al., 2008.
Ácido geniposídico (Folhas)		HENNEBELLE, 2006; HENNEBELLE et al., 2008.
5-hidroxi-geniposideo ou tevesideo (Folhas)		HENNEBELLE, 2006; HENNEBELLE et al., 2008.
Cariptosideo (Folhas)		HENNEBELLE, 2006; HENNEBELLE et al., 2008.
Musaenosideo (Folhas)		HENNEBELLE, 2006; HENNEBELLE et al., 2008.
8- <i>epi</i> -loganina ou 8- <i>epi</i> -loganosideo (Folhas)		HENNEBELLE, 2006; HENNEBELLE et al., 2008.

Geniposideo
(Folhas)



HENNEBELLE,
2006;
HENNEBELLE et
al., 2008.

2.2.5 Toxicidade

A toxicidade do extrato aquoso de *L. alba* foi objeto de investigação pela extinta Central de Medicamentos (CEME). O parecer técnico deste órgão revelou que o índice de letalidade foi elevado quando os animais receberam as preparações por via intraperitoneal. Além disso, em doses elevadas (200 mg/Kg) foram observados nítidos efeitos tóxicos (BRASIL, 2006). Outro estudo determinou que, pela via oral, a DL₅₀ em ratos foi de 460 mg/Kg para o extrato etanólico das folhas e 1466 mg/kg para o extrato clorofórmico das raízes (AGUIAR, 2006 apud HENNEBELLE et al., 2008).

3 MANUSCRITOS CIENTÍFICOS

3.1 Manuscrito 1

BARROS, F. M. C.; ZAMBARDA, E. O.; HEINZMANN, B. M.; MALLMANN, C. A. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). Submetido à Química Nova.

**VARIABILIDADE SAZONAL E BIOSÍNTESE DE TERPENÓIDES PRESENTES NO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. BROWN (VERBENACEAE)**

**Francisco Maikon Corrêa de Barros, Eduardo de Oliveira Zambarda, Berta Maria
Heinzmann***

Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa
Maria, Prédio 26, Campus Universitário. CEP 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil.

Carlos Augusto Mallmann

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade
Federal de Santa Maria, Prédio 44, Campus Universitário. CEP 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil.

*e-mail: berta.heinzmann@gmail.com

Seasonal variability and terpenoid biosynthesis of the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N. E. BROWN (Verbenaceae). The essential oil of the leaves of *Lippia alba* chemotype linalool-1,8-cineol was extracted by hidrodistillation at different seasons and analyzed by GC/MS. Qualitative and quantitative variations in regard to the period of harvesting have been performed and the results were correlated with meteorological data. The essential oil yield varied from 0.33 % to 0.67 %. The chemical diversity of the constituents increased throughout the year, being 1,8-cineol and linalool the major components. Possible biosynthetic routes of mono and sesquiterpenoids present in the essential oil are discussed.

KEY WORDS: *Lippia alba*, terpenoids, seasonal variability.

INTRODUÇÃO

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) é uma planta medicinal nativa da América do Sul, conhecida popularmente como falsa-melissa.¹ Infusões, banhos e xaropes, preparados com suas folhas ou raízes, são utilizados na medicina popular para o tratamento de distúrbios estomacais, afecções das vias respiratórias, no combate à hipertensão e como sedativo.²

Entre os metabólitos secundários descritos para *L. alba* encontram-se flavonóides, taninos, iridóides, saponinas triterpênicas, resinas, mucilagens e óleo essencial.³

Variações qualitativas e quantitativas dos principais componentes do óleo essencial desta espécie têm levado a sua separação em quimiotipos ou raças químicas: citral,^{4,5} carvona,⁴ linalol – 1,8-cineol,⁶ entre outros. Adicionalmente, a influência de fatores abióticos como luz, temperatura, água, solo e altitude sobre a biossíntese de certos constituintes vegetais, especialmente os terpenóides, foi comprovada em diferentes espécies vegetais.⁷ A variabilidade na composição do óleo essencial das folhas de *L. alba* foi demonstrada anteriormente em função das diferentes regiões do ramo vegetal,⁵ das épocas e horários de coleta,^{5,6,8} bem como da metodologia empregada na sua extração.⁹ No entanto, até o momento, não há trabalhos publicados interligando, por meio de dados meteorológicos, as variações observadas aos fatores abióticos.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a variação do teor e da composição química do óleo essencial das folhas de *L. alba*, provenientes de cultivo e coletadas nas diferentes estações do ano, relacionando as variações observadas com dados meteorológicos de temperatura, insolação, umidade relativa e chuva acumulada. As possíveis rotas biossintéticas para os mono e sesquiterpenóides presentes no óleo essencial também são discutidas.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal

Para a realização dos experimentos foram utilizadas as folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae), quimiotipo linalol-1,8-cineol, provenientes de cultivo no Horto da Prefeitura

Municipal de São Luiz Gonzaga, RS, Brasil. As coletas foram realizadas no período médio de cada estação (janeiro, abril, julho e outubro) durante o ano de 2005. A espécie foi identificada pelo botânico Gilberto Dolejal Zanetti, do Departamento de Farmácia Industrial da UFSM. Material testemunha encontra-se depositado no Herbário do Departamento de Biologia da UFSM, sob o registro SMDB nº 10.050.

Extração e análise do óleo essencial

O óleo essencial foi extraído a partir do material vegetal fresco, submetido à hidrodestilação em aparelho clevenger por 2 h, conforme a metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira.¹⁰ O rendimento das extrações foi calculado com base na relação entre volume e peso, e expresso em porcentagem (% v/p).

A análise do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) em um sistema hifenado AGILENT 6890, equipado com um detector seletivo de massas série 5973. Parâmetros de análise: split inlet 1:100; gás carreador: He (1 mL/min); coluna capilar de sílica fundida HP5-MS (Hewlett Packard, 5 % fenilmetilsiloxano, 30 m x 0,25 mm, espessura do filme: 0,25 µm); programa de análise: 40 °C (Ti) por 4 min, 40-260 °C, 4 °C/min; temperatura do injetor: 220 °C; temperatura da interface: 250 °C; energia de ionização: 70 eV; banco de dados: NIST, 1998.

Os componentes do óleo essencial foram identificados com base no índice de retenção (IR), determinados através da utilização de uma curva de calibração de uma série homóloga de *n*-alcanos (C₈-C₃₂) injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras e nos modelos de fragmentação dos espectros de massas, sendo ambos comparados com dados da literatura.¹¹

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 o cromatógrafo gasoso (Tabela 2).

Levantamento dos dados meteorológicos

Os dados meteorológicos de temperatura, insolação, umidade relativa do ar e índice pluviométrico foram obtidos a partir dos registros do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), o qual mantém uma estação de observação na cidade de São Luiz Gonzaga. Os dados foram tabulados e utilizados, para fins de comparação, com as variações quantitativas e qualitativas observadas para o óleo essencial de *L. alba*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento do óleo essencial obtido nas diferentes extrações foi de 0,67 % em janeiro (verão), 0,60 % em abril (outono), 0,33 % em julho (inverno) e 0,40 % em outubro (primavera) (Figura 1). Os resultados encontram-se de acordo com os dados publicados na literatura, que mostram variações de rendimento para o óleo essencial de *L. alba* na ordem de 0,1 - 1,0 %, ¹² bem como a influência das diferentes épocas de coleta sobre os teores.^{5, 6, 8, 13} Dessa forma, no verão ocorrem os maiores teores de óleo essencial, os quais decaem no outono até atingir valores mínimos no inverno. A partir deste ponto, os teores voltam a crescer em direção à primavera e ao verão.

“Figura 1”

A correlação dos resultados apresentados na Figura 1 com os dados meteorológicos (Tabela 1) permite aferir que a combinação de fatores típicos à estação do verão no sul do país (altas temperaturas, longos períodos de insolação, baixos índices de umidade relativa do ar e de precipitação) favorece o aumento da produção de óleo essencial. No inverno, por sua vez, sob condições de baixas temperaturas, curtos períodos de insolação e elevados índices de umidade relativa do ar e de precipitação, ocorre diminuição dos teores. Resultados semelhantes foram obtidos para *L. alba* quimiotipo citral – limoneno coletada no Ceará, porém em épocas distintas, onde uma estação chuvosa, popularmente conhecida como inverno (janeiro – junho), e outra seca,

denominada de verão (julho – dezembro), são bem definidas na região.⁸ As estações de transição, outono e primavera (Figura 1), com características mistas entre as duas outras estações do ano (Tabela 1), refletem também teores intermediários de óleo essencial.

“Tabela 1”

Segundo Tavares *et al.*, 2005,¹³ os teores de óleo essencial em *L. alba* podem variar em função do seu ciclo fenológico, sendo que para esta espécie a maior produção de óleo ocorre fora do período de floração. Entretanto, as evidências apontam que as condições climáticas também constituem um forte fator de influência. Para *L. alba* coletada em Caxias do Sul - RS, os rendimentos do óleo extraído (0,10 % - 0,37 %)⁶ ficaram abaixo daqueles encontrados em São Luiz Gonzaga (0,33 % - 0,67 %). Caxias do Sul – RS apresenta, reconhecidamente, temperaturas médias mais baixas, quando comparadas àquelas de São Luiz Gonzaga (Tabela 1), sendo este um dos prováveis fatores que corroboram com as diferenças de rendimento observadas.

Os componentes dos óleos essenciais de *L. alba* obtidos das folhas coletadas nas quatro estações do ano de 2005 são apresentados na Tabela 2. Ao todo foram identificados 42 constituintes. Os óleos analisados são compostos basicamente por mono e sesquiterpenóides. Linalol e 1,8-cineol foram os constituintes majoritários em todas as estações do ano, indicando o quimiotipo da espécie na população de plantas estudada. Percentagens semelhantes de linalol (50,0 – 79,2 %) e 1,8-cineol (7,3 – 14,1 %) foram encontradas para os óleos essenciais obtidos das folhas de *L. alba* coletadas em Caxias do Sul.⁶ O terceiro constituinte em maior proporção varia de acordo com a estação da coleta, consistindo do germacreno D (verão e primavera) ou da cânfora (outono e inverno) (Tabela 2).

A porcentagem relativa de monoterpenóides hidrocarbonados variou na faixa de 1,7 – 4,0 %, enquanto que, no caso dos monoterpenóides oxigenados, a variação foi de 68,4 – 81,0 %. Já para os sesquiterpenóides hidrocarbonados, a concentração variou de 3,9 – 20,8 %, enquanto que os

sesquiterpenóides oxigenados apresentaram-se em porcentagens que variaram de 2,4 – 6,5 %.

“Tabela 2”

Os resultados indicam que a sazonalidade afeta de maneira distinta a biossíntese do número de estruturas das duas principais classes de terpenóides presentes no óleo essencial de *L. alba* (Figura 2). Enquanto que, em janeiro, foi observado o predomínio de estruturas sesquiterpenoídicas com relação às monoterpenoídicas, em abril prevaleceram os constituintes de estrutura monoterpenoídica. Já nos meses de julho e outubro o número de sesquiterpenóides voltou a predominar.

Uma projeção gráfica mostra, nas proximidades de fevereiro e junho, pelo menos dois momentos em que o número de mono e sesquiterpenóides seriam provavelmente equivalentes. Os dados demonstram que, ao longo do ano, a diversidade química dos constituintes aumentou gradativamente, sendo 20 em janeiro, 23 em abril, 30 em julho e 35 em outubro (Tabela 2, Figura 2). Este aumento pode ser atribuído à versatilidade catalítica das enzimas terpeno-sintetases, que freqüentemente produzem múltiplos produtos a partir de um único substrato.¹⁴ Coincidentemente, a estação em que ocorre a maior diversidade química no óleo essencial (primavera) também corresponde ao período de maior floração observado para esta espécie (Figura 2).

“Figura 2”

Cabe ressaltar que nem sempre o favorecimento na produção de uma determinada classe química, mono ou sesquiterpenóide, vem acompanhada do aumento da porcentagem relativa de seus constituintes individuais. É o caso do linalol, um monoterpenóide que, do verão para o inverno, tem sua porcentagem relativa diminuída (Tabela 2), enquanto que ocorre um aumento do número absoluto dos constituintes de estrutura monoterpenóide ou este permanece praticamente constante.

(Figura 2). Algumas hipóteses poderiam justificar essas observações. Entre elas encontra-se o fato de que as plantas, através de mecanismos de controle da rota biossintética, favorecem a produção de determinados constituintes, dependendo de suas necessidades.^{15, 16}

Os terpenóides, em especial mono e sesquiterpenóides, apresentam diversas funções nos vegetais. As mais conhecidas dizem respeito aos efeitos de proteção contra herbívoros e agentes microbianos, bem como atração de polinizadores. Outras funções, ainda pouco estabelecidas para a maioria dos derivados isoprênicos, envolvem efeitos de termo-proteção, proteção a danos oxidativos, foto-respiração a altas temperaturas e baixas concentrações de O₂, alelopatia e foto-proteção.¹⁷ De acordo com Bouvier *et al.*, 2005,¹⁸ o β -ocimeno parece ter um papel chave na defesa contra herbívoros, resistência a patógenos e tolerância a altas temperaturas. Este monoterpênóide foi identificado no óleo essencial obtido das folhas coletadas em abril (outono) e em outubro (primavera) (Tabela 2). Segundo Schnee *et al.*, 2002,¹⁹ o (*E*)- β -farneseno, encontrado no óleo de *L. alba* extraído no verão, também atuaria em processos de defesa ao ataque de herbívoros.

As condições climáticas podem beneficiar a biossíntese de um constituinte terpenoídico por uma espécie vegetal, através do favorecimento de sua atividade enzimática. Para a terpeno-sintetase denominada TPS1, isolada e expressa em *Escherichia coli*, a qual produziu linalol, entre outros constituintes, determinou-se que a temperatura ótima de reação está entre 30 e 37 °C.¹⁹ Portanto, o fato da temperatura ser um fator importante para a atividade enzimática e esta ser uma variável da sazonalidade, pode justificar o aumento do rendimento de óleo essencial, bem como da produção de certos constituintes, em épocas do ano que apresentem temperaturas mais elevadas.

Há pelo menos duas vias envolvidas na biossíntese dos terpenóides: uma via citosólica ou rota do mevalonato (MVA) e outra plastidial ou rota do 5-fosfato de 1-desoxi-D-xilulose (DXP). Ambas conduzem à produção de isômeros do isopreno, o difosfato de isopentenila (IPP) e/ou o difosfato de gama, gama-dimetilalila (DMAPP), os quais constituem os monômeros a partir dos quais originam-se os diferentes terpenóides. A partir da condensação de uma molécula de IPP com DMAPP forma-se o difosfato de geranila (GPP), precursor dos monoterpênóides. A condensação de uma

nova molécula de IPP e do GPP leva ao precursor dos sesquiterpenóides, difosfato de farnesila (FPP).^{18, 20} A possível rota biossintética dos principais mono e sesquiterpenóides encontrados no óleo essencial de *L. alba* é apresentada no Esquema 1. Este foi elaborado com base nos dados disponíveis na literatura.^{14, 15, 19-44} Da mesma forma que ocorre com os produtos intermediários, os compostos finais das rotas biossintéticas são apresentados em estruturas planas, uma vez que a metodologia empregada para a análise do óleo essencial não permite a determinação da configuração absoluta dos constituintes. Entretanto, geralmente ocorre simetria nos mecanismos de reação, o que possibilita a formação dos diferentes enantiômeros por meio de rotas paralelas.¹⁴ A numeração dos carbonos mencionados nesta discussão é relativa ao GPP e FPP.

“Esquema 1”

A biossíntese dos monoterpenóides (Esquema 1) tem início com a ionização do difosfato de geranila (GPP) [1]. A desprotonação do C4 do cátion linalílico [2], resultante desta ionização, leva à obtenção do *E*- β -ocimeno [3]. Sua hidratação, por sua vez, dá origem ao linalol [4].^{14, 19, 20} Uma proposta para a biossíntese do óxido de linalol [6] consiste na hidroxilação do linalol [4] pela ação das enzimas do citocromo P-450 via intermediário 6,7 epóxido de linalol [5].^{38, 39} Além desta, foi demonstrado que a auto-oxidação do linalol [4], pela sua exposição ao oxigênio do ar, também conduz ao óxido de linalol [6].⁴⁰

A isomerização do GPP [1], obtida com a migração do grupamento difosfato do C1 para o C3, resulta no difosfato linalílico (LPP) [7]. A subsequente rotação da ligação C2-C3 e ionização resultam no isômero do cátion linalílico [2'], que difere do primeiro por apresentar características espaciais favoráveis à ciclização molecular. Desta forma, além de formar o β -mirceno [8] pela perda de próton no C10,^{14, 19, 20} a ciclização do isômero do cátion linalílico [2'], entre C1 e C6, conduz ao cátion α -terpinílico [9], um intermediário chave da biossíntese dos monoterpenóides cíclicos^{14, 20} (Esquema 1).

A desprotonação do C8 do cátion α -terpinílico [9] favorece a produção do limoneno [10],^{14, 20} cuja hidroxilação por enzimas do citocromo P-450 origina o *E*-carveol [11].^{15, 20, 23, 24} Quando a saída do próton ocorre no C6, forma-se o terpinoleno [13]¹⁴ que, por isomerização, passaria a isoterpinoleno [14]. Muitos terpenóides são produtos diretos das enzimas terpeno-sintetases, enquanto outros são obtidos após transformações secundárias,¹⁵ o que parece ser o caso do isoterpinoleno [14]. A literatura também descreve sua formação mediante a biotransformação do isolimoneno [12] pela bactéria desnitrificante *Alcaligenes defragans* a qual, entre outros, utiliza limoneno [10] como substrato.³¹ Embora não exista a comprovação desta rota em vegetais, em *L. alba* o limoneno [10] ocorre em maior quantidade no mês de abril, que também é o único mês em que foi identificado o isoterpinoleno [14] (Tabela 2). Entretanto, em função da escassa literatura sobre este aspecto, não se pode descartar a possibilidade do isoterpinoleno [14] ser formado por outra via, como a partir do terpinoleno [13], já demonstrada através de isomerização físico-química⁴⁴ (Esquema 1).

Via cátion α -terpinílico [9], a biossíntese dos constituintes α -tujona [15], sabineno [16] e *Z*-hidrato de sabineno [17] inicia com a migração de hidreto do C6 para o C7 e segue com o ataque eletrofílico do C6 aos elétrons dupla ligação entre C2-C3, para formar um intermediário bicíclico de carga positiva no C3. A partir deste, a desprotonação do C4 ou C10 leva a formação, respectivamente, de α -tujona [15] e/ou sabineno [16].^{14, 20} Já a hidratação explica a formação do *Z*-hidrato de sabineno [17]^{29, 30, 37} (Esquema 1).

A hidratação do cátion α -terpinílico [9] gera o α -terpineol [18]^{20, 22, 43} o qual, por heterociclicização, produz o 1,8-cineol [19]²² (Esquema 1).

A ciclização eletrofílica do cátion α -terpinílico [9] gera os cátions pinílico [20] e bornílico [25]. A desprotonação do cátion pinílico [20] no C4 e/ou C10 conduz, respectivamente, ao α -pineno [21] e/ou β -pineno [22].^{20, 21, 22, 27} As ações das enzimas do citocromo P-450^{15, 36} sobre o β -pineno [22], em um processo análogo à biossíntese da carvona,^{20, 23, 24} formam o pinocarveol [23], cuja desidrogenação oxidativa resulta na pinocarvona [24]³⁶ (Esquema 1).

Um rearranjo do cátion bornílico [25] do tipo Wagner-Meerwein, gera o cátion canfílico [26] que, por desprotonação do C10, leva ao canfeno [27].²⁷ Alternativamente, o cátion bornílico [25] pode capturar um grupo difosfato formando o difosfato de bornila [28],^{20, 21, 22} o qual é convertido em borneol [29]. A oxidação enzimática do borneol [29] origina a cânfora [30].^{26, 34} Em contrapartida, a acilação enzimática do borneol [29], em semelhança ao que ocorre com outras substâncias,¹⁵ resultaria no acetato de isobornila [31] (Esquema 1).

Como pode ser notado no esquema 1, o linalol [4] é um dos primeiros constituintes a ser biossintetizado. O fato de sua biossíntese envolver poucas etapas pode contribuir para sua presença em altas concentrações no óleo essencial de *L. alba*. Comparando as porcentagens relativas de alguns monoterpenóides (Tabela 2), observa-se que a do linalol diminui no inverno, enquanto que a de outros compostos como o α -pineno, canfeno, sabineno, 1,8-cineol, cânfora, pinocarvona e borneol aumentam. Associadas aos efeitos de uma maior ou menor atividade enzimática, estas observações também levam a supor que exista algum mecanismo de controle da rota biossintética.¹⁵ É possível que, em épocas de temperatura elevada (Tabela 1), uma maior taxa de volatilização do linalol direcione sua biossíntese na elaboração de maior quantidade do produto. Já em períodos de baixas temperaturas ocorreria o contrário, restando assim mais substrato (GPP) para ser transformado nos demais monoterpenóides citados.

A formação dos sesquiterpenóides tem início (Esquema 1) com ionização do difosfato de farnesila (FPP) [32]. O cátion resultante [33] pode ser desprotonado no C15 para formar *E*- β -farneseno [34] ou pode sofrer hidratação para formar *E*-nerolidol [35].^{14, 19} A migração do grupamento difosfato de C1 para C3 em [33] resulta no difosfato de nerolidila (NPP) [36].^{14, 42} A partir deste ponto, a biossíntese dos demais sesquiterpenóides desenvolve-se via ionização direta e/ou rotação da ligação entre C2 e C3 e posterior ionização do isômero NPP [36’].

A ionização direta do NPP [36] e sua subsequente ciclização entre C10-C1 leva a formação do cátion germacrílico [38]. A saída de um próton, por vezes associada a um deslocamento intramolecular de hidreto, conduz a formação dos germacrenos A [39], B [41], D [42] e C [46].^{20, 42}

A nova protonação destes constituintes no C6 conduz a obtenção de estruturas do tipo eudesmano, enquanto que a protonação no C3, leva aos derivados do tipo azulano ou guaiano,^{33, 42} como o aloaromadendreno [45].²⁰ Outro constituinte também obtido pela via dos germacrenos é o germacreno-D-4-ol [43], obtido provavelmente pela hidratação do germacreno D (Esquema 1).

O β -elemeno [40] pode ser considerado um subproduto originado durante o processo de extração do óleo essencial por hidrodestilação e análise por cromatografia gasosa pois, sob condições ligeiramente ácidas ou de aquecimento, este constituinte é facilmente obtido a partir do germacreno A através do rearranjo de Cope³³ (Esquema 1).

A ciclização do cátion NPP [37] entre C11-C1, associado à desprotonação do C9, leva a formação do α -humuleno [47]. Quando esta ciclização vem acompanhada da formação de uma ligação adicional entre C2-C10, além da desprotonação do C15 forma-se o *E*- β -cariofileno [48].⁴² A via do isômero do NPP [37'] também pode ser utilizada para a formação deste constituinte, bem como do *E*- β -farneseno [34] apresentado anteriormente.⁴² O óxido de cariofileno [49], por sua vez, mostrou ser um subproduto da auto-oxidação do *E*- β -cariofileno [48] pela sua exposição ao oxigênio do ar⁴¹ (Esquema 1).

A ciclização do isômero do NPP [37'] entre C10-C1 conduz à formação do cátion germacradienílico ou (*E*, *Z*)-germacrílico [50]. Adotando como ponto de partida este cátion [50], a seqüência de reações envolvendo deslocamento intramolecular de hidreto,^{20, 42} ciclização entre C7-C1, ciclização entre C6-C2 e desprotonação do C15 levaria a formação do β -bourboneno [51] (Esquema 1).

O isômero do cátion germacradienílico [50'], obtido após o deslocamento de hidreto, pode ciclizar entre C6-C1, formando o cátion cadinílico [53]^{20, 42} ou, através da saída de um próton e adicional ciclização entre C1 e C11, originar o biciclogermacreno [52]^{28, 35} (Esquema 1).

A partir do cátion cadinílico [53], por meio de uma ligação entre C2-C7, forma-se um intermediário tricíclico que, desprotonado, leva aos constituintes α -copaeno [54] e/ou β -copaeno [55].⁴² Através da migração de hidreto-1,2 do carbocátion cadinílico [53] e ciclização entre C2-C6,

origina-se outro intermediário tricíclico capaz de formar, por desprotonação do C-15, o β -cubebeno [56]³⁵ e, provavelmente, pela reação com água, o cubebol [57]. Alternativamente, o mesmo cátion cadinílico [53], por deslocamento de um hidreto, seguido da adição de água, forma o 1,10-di-epi-cubenol [58].²⁰ Cane e Ke, 2000²⁵ demonstraram experimentalmente que o átomo de oxigênio do grupo hidroxila do epicubenol, um isômero do 1,10-di-epi-cubenol [58], deriva exclusivamente da água. Segundo estes autores, a reação do cátion cadinílico [53] com a água levaria a formação dos isômeros do cadinol,³² como τ -murulol e/ou α -cadinol [59]. Em contrapartida, de maneira análoga ao que ocorre quando da formação de outros derivados de esqueleto cadinano,⁴² a saída de um próton do cátion cadinílico [53] conduziria a biossíntese do α -muruleno [60] e/ou γ -muruleno [61] (Esquema 1).

AGRADECIMENTOS

À Farmacopéia Brasileira pelo apoio e ao Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) – Distrito de Porto Alegre pelo fornecimento dos dados meteorológicos.

Apoio Financeiro: CAPES e CNPq

REFERÊNCIAS

1. Biasi, L. A.; Costa, G.; *Cienc. Rural* **2003**, *33*, 455.
2. Stasi, L. C.; Oliveira, G. P.; Carvalhaes, M. A.; Queiroz-Junior, M.; Tien, O. S.; Kakinami, S. H.; Reis, M. S.; *Fitoterapia* **2002**, *73*, 69.
3. Pascual, M. E.; Slowing, K.; Carretero, E.; Mata, D. S.; Villar, A.; *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *76*, 201.
4. Matos, F. J. A.; Machado, M. I. L.; Craveiro, A. A.; Alencar, J. W.; *J. Essent. Oil Res.* **1996**, *8*, 695.
5. Castro, D. M.; Ming, L. C.; Marques, M. O. M.; *Rev. Bras. Pl. Med.* **2002**, *4*, 75.

6. Atti-Serafini, L.; Pansera, M. R.; Atti-Santos, A. C.; Rossato, M.; Pauletti, G. F.; Rota, L. D.; Paroul, N.; Moyna, P.; *Rev. Bras. Pl. Med.* **2002**, *4*, 72.
7. Lima, H. R. P.; Kaplan, M. A. C.; Cruz, A. V. M. C.; *Floresta Ambient.* **2003**, *10*, 71.
8. Nagao, E. O.; Innecco, R.; Mattos, S. H.; Medeiros Filho, S.; Marco, C. A.; *Rev. Ciên. Agron.* **2004**, *35*, 355.
9. Stashenko, E. E.; Jaramillo, B. E.; Martinez, J. R.; *J. Chromatogr., A* **2004**, *1025*, 93.
10. *Farmacopéia Brasileira*, IV ed., Atheneu: São Paulo, 2000.
11. Adams, R. P.; *Identification of essential oil components by gas chromatography/quadupole mass spectroscopy*, Allured Publishing Corporation: Illinois, 2001.
12. Terblanché, F. C.; Kornelius, G.; *J. Essent. Oil Res.* **1996**, *8*, 471.
13. Tavares, E. S.; Julião, L. S.; Lopes, D.; Bizzo, H. R.; Lage, C. L. S.; Leitão, S. G.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2005**, *15*, 1.
14. Köllner, T. G.; Schnee, C.; Gershenzon, J.; Degenhardt, J.; *Plant Cell* **2004**, *16*, 1115.
15. Dudareva, N.; Pichersky, E.; Gershenzon, J.; *Plant Physiol.* **2004**, *135*, 1893.
16. Cheng, A.; Lou, Y.; Mao, Y.; Lu, S.; Wang, L.; Chen, X.; *J. Integr. Plant Biol.* **2007**, *49*, 179.
17. Owen, S. M.; Peñuelas, J.; *Trends Plant Sci.* **2005**, *10*, 420.
18. Bouvier, F.; Rahier, A.; Câmara, B.; *Prog. Lipid Res.* **2005**, *44*, 357.
19. Schnee, C.; Köllner, T. G.; Gershenzon, J.; Degenhardt, J.; *Plant Physiol.* **2002**, *130*, 2049.
20. Dewick, P. M.; *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 181.
21. Bohlmann, J.; Steele, C. L.; Croteau, R.; *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 21784.
22. Bohlmann, J.; Meyer-Gauen, G.; Croteau, R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 4126.
23. Bouwmeester, H. J.; Gershenzon, J.; Konings, M. C. J. M.; Croteau, R.; *Plant Physiol.* **1998**, *117*, 901.
24. Bouwmeester, H. J.; Konings, M. C. J. M.; Gershenzon, J.; Karp, F.; Croteau, R.; *Phytochemistry* **1999**, *50*, 243.
25. Cane, D. E.; Ke, N.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 105.

26. Croteau, R.; Felton, M.; Karp, F.; Kjonaas, R.; *Plant Physiol.* **1981**, *67*, 820.
27. Croteau, R.; Satterwhite, D. M.; Cane, D. E.; Changn, C. C.; *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 10063.
28. Hackl, T.; König, W. A.; Muhle, H.; *Phytochemistry* **2004**, *65*, 2261.
29. Hallahan, T. W.; Croteau, R.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1988**, *264*, 618.
30. Hallahan, T. W.; Croteau, R.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, *269*, 313.
31. Heyen, U.; Harder, J.; *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, *169*, 67.
32. Isaksson, D.; *Doctoral Thesis*, Mid Sweden University, Sweden, 2006.
33. Kraker, J.; Franssen, M. C. R.; Groot, A.; König, W. A.; Bouwmeestr, H. J.; *Plant Physiol.* **1998**, *117*, 1381.
34. Lamarti, A.; Badoc, A.; Deffieux, G.; Carde, J. -P.; *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* **1994**, *133*, 100.
35. Little, D. B.; Croteau, R. B.; *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *402*, 120.
36. Mau, C. J. D.; Croteau, R.; *Phytochem. Rev.* **2006**, *5*, 373.
37. Novak, J.; Bitsch, C.; Pank, F.; Langbehn, J.; Franz, C. M.; *Euphytica* **2002**, *127*, 69.
38. Pichersky, E.; Raguso, R. A.; Lewinsohn, E.; Croteau, R.; *Plant Physiol.* **1994**, *106*, 1533.
39. Raguso, R. A.; Pichersky, E.; *Plant Species Biol.* **1999**, *14*, 95.
40. Sköld, M.; Borje, A.; Harambasic, E.; Karlberg, A.; *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 1697.
41. Sköld, M.; Karlberg, A.; Matura, M.; Börje, A.; *Food Chem. Toxicol.* **2006**, *44*, 538.
42. Steele, C. L.; Crock, J.; Bohlmann, J.; Croteau, R.; *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 2078.
43. Wise, M. L.; Savage, T. J.; Katahira, E.; Croteau, R.; *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 14891.
44. Yadav, M. K.; Chudasama, C. D.; Jasra, R. V.; *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2004**, *216*, 51.

Figura 1. Perfil quantitativo do óleo essencial das folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown coletada em São Luiz Gonzaga, RS, Brasil, nas diferentes estações de 2005.

Figura 2. Variabilidade sazonal das principais classes constituintes do óleo essencial das folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown coletadas em São Luiz Gonzaga, RS, Brasil, em 2005.

Esquema 1. Possíveis rotas biossintéticas dos monoterpenóides e sesquiterpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba*. Denominação dos constituintes e intermediários: [1] Difosfato de geranila (GPP), [2] Cátion linalílico, [2'] Cátion linalílico / isômero [3] *E*- β -Ocimeno, [4] Linalol, [5] 6,7 Epóxido de linalol, [6] Óxido de linalol, [7] Difosfato de linalila (LPP), [7'] Difosfato de linalila (LPP) / isômero, [8] β -Mirceno, [9] Cátion α -terpinílico, [10] Limoneno, [11] *E*-carveol, [12] Isolimoneno, [13] Terpinoleno, [14] Isoterpinoleno, [15] α -Tujona, [16] Sabineno, [17] *Z*-Hidrato de sabineno, [18] α -Terpineol, [19] 1,8-Cineol, [20] Cátion pinílico, [21] α -Pineno, [22] β -Pineno, [23] Pinocarveol, [24] Pinocarvona, [25] Cátion bornílico, [26] Cátion canfílico, [27] Canfeno, [28] Difosfato de bornila, [29] Borneol, [30] Cânfora, [31] Acetato de isobornila, [32] Difosfato de farnesila (FPP), [33] Cátion difosfato farnesílico, [34] *E*- β -Farneseno, [35] *E*-Nerolidol, [36] Difosfato de nerolidila (NPP), [36'] Difosfato de nerolidila (NPP) / isômero, [37] Cátion difosfato nerolídico (NPP), [37'] Cátion difosfato nerolidílico / isômero, [38] Cátion germacrílico, [39] Germacreno A, [40] β -Elemeno, [41] Germacreno B, [42] Germacreno D, [43] Germacreno-D-4-ol, [44] Cátion alo-aromadendrenílico, [45] Alo-aromadendreno, [46] Germacreno C, [47] α -Humuleno, [48] *E*- β -Cariofileno, [49] Óxido de cariofileno, [50] Cátion germacradienílico, [51] β -Burboneno, [52] Bicyclogermacreno, [53] Cátion cadinílico, [54] α -Copaeno, [55] β -Copaeno, [56] β -Cubebeno, [57] Cubebol, [58] 1,10-Di-epi-cubenol, [59] τ -Murulol ou α -Cadinol, [60] α -Muruleno, [61] γ -Muruleno. OPP = Difosfato; Ac = Acetato.

Figura 1. Perfil quantitativo do óleo essencial das folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown coletada em São Luiz Gonzaga, RS, Brasil, nas diferentes estações de 2005.

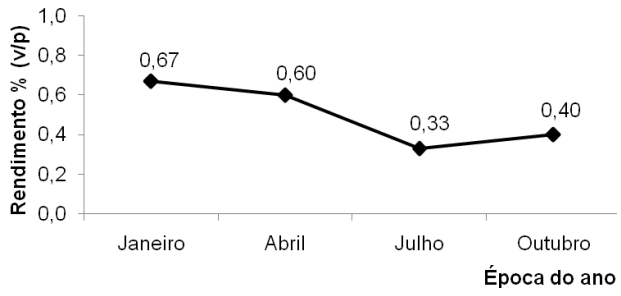


Figura 2. Variabilidade sazonal das principais classes constituintes do óleo essencial das folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown coletadas em São Luiz Gonzaga, RS, Brasil, em 2005.

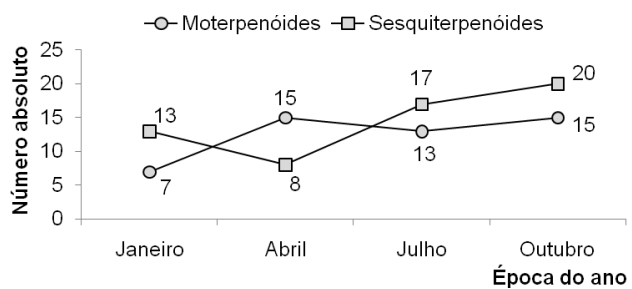


Tabela 1. Dados meteorológicos das quatro estações do ano de 2005 em São Luiz Gonzaga.

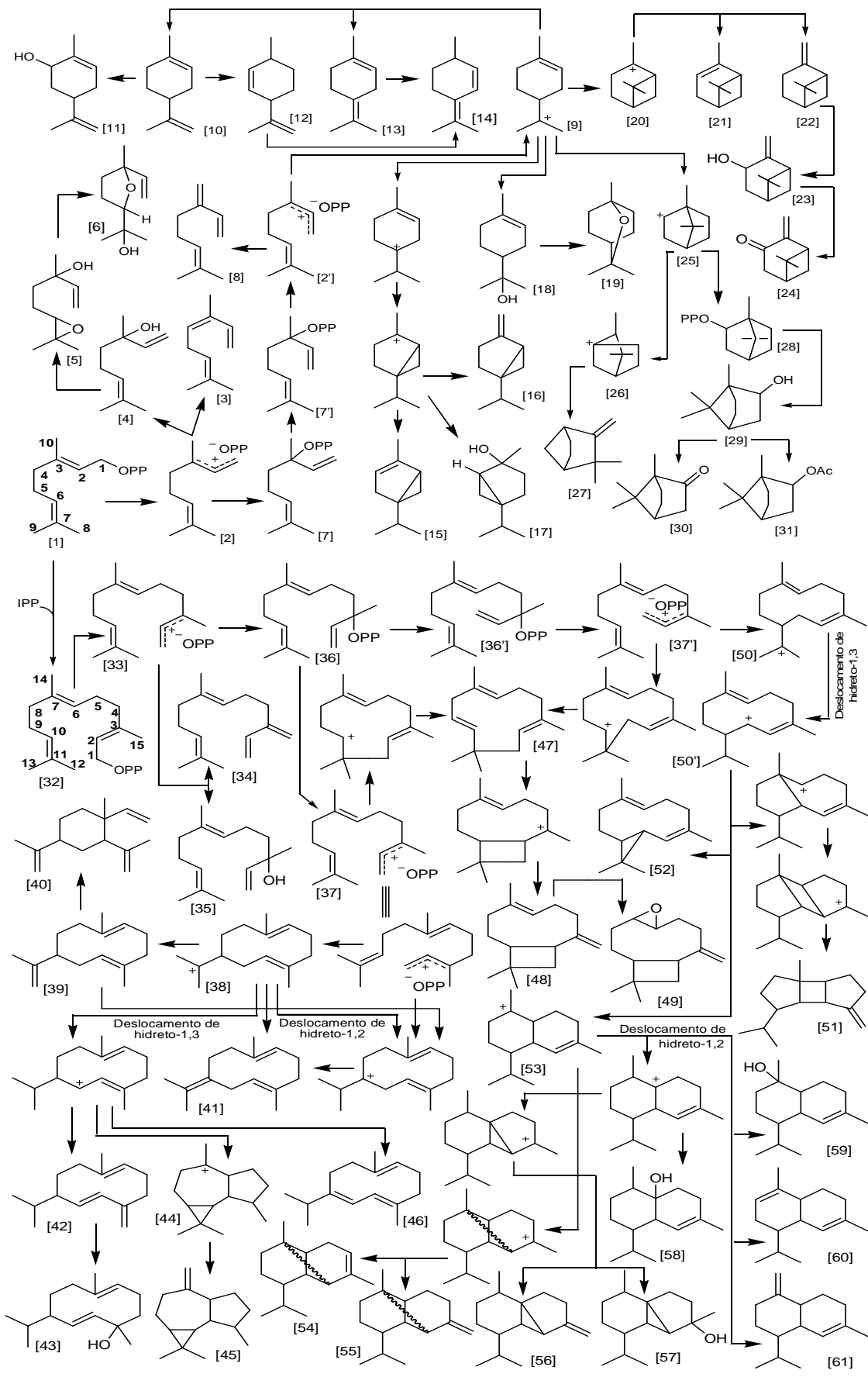
Média	Verão	Outono	Inverno	Primavera
Temperatura (°C)	25,7	21,3	15,2	19,6
Insolação Total (Horas)	242,7	171,4	152,9	172
Umidade Relativa do Ar (%)	67	77	77	71
Chuva acumulada (mm)	99,7	235,8	200,3	192,2
Dias com chuva	6	12	11	10

Tabela 2. Constituintes químicos do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown nas quatro estações do ano de 2005.

Fórmula	Componente	Janeiro (Verão)			Abril (Outono)			Julho (Inverno)			Outubro (Primavera)			
		%	Tr	IRcal	%	Tr	IRcal	%	Tr	IRcal	%	Tr	IRcal	IRref
C ₁₀ H ₁₆	α-Tujona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	t	10,49	925	930
C ₁₀ H ₁₆	α-Pineno	-	-	-	0,2	10,75	931	0,3	10,75	931	0,1	10,74	931	939
C ₁₀ H ₁₆	Canfeno	-	-	-	0,3	11,41	947	0,7	11,41	947	t	11,41	947	954
C ₁₀ H ₁₆	Sabineno	1,2	12,40	971	1,7	12,42	972	2,1	12,41	971	1,4	12,41	971	975
C ₁₀ H ₁₆	β-Pineno	-	-	-	-	-	-	0,3	12,57	975	0,1	12,56	975	979
C ₁₀ H ₁₆	Mirceno	0,3	13,17	990	0,4	13,17	990	0,1	13,20	991	-	-	-	991
C ₁₀ H ₁₆	Limoneno	0,2	14,72	1029	0,7	14,73	1029	0,5	14,74	1029	0,1	14,75	1029	1029
C ₁₀ H ₁₈ O	1,8-cineol	7,9	14,86	1032	10,4	14,86	1032	13,0	14,85	1032	8,8	14,86	1032	1031
C ₁₀ H ₁₆	(E)- β-Ocimeno	-	-	-	0,3	15,51	1048	-	-	-	0,1	15,55	1049	1050
C ₁₀ H ₁₈ O	(Z)-Hidrato de sabineno	-	-	-	-	-	-	0,2	16,50	1073	0,1	16,50	1073	1070
C ₁₀ H ₁₈ O ₂	(E)-Óxido de linalol	-	-	-	0,3	16,50	1073	-	-	-	-	-	-	1073
C ₁₀ H ₁₈ O ₂	(Z)-Óxido de linalol	0,2	17,13	1089	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1087
C ₁₀ H ₁₆	Isoterpinoleno	-	-	-	0,2	16,99	1085	-	-	-	-	-	-	1088
C ₁₀ H ₁₈ O	Linalol	65,5	17,79	1106	63,7	17,76	1105	48,7	17,75	1105	58,2	17,79	1106	1097
C ₁₀ H ₁₆ O	Cânfora	-	-	-	4,4	19,42	1149	8,4	19,41	1149	0,4	19,42	1149	1146
C ₁₀ H ₁₄ O	Pinocarvona	-	-	-	0,4	20,00	1164	0,5	20,00	1164	0,1	20,00	1164	1165
C ₁₀ H ₁₈ O	Borneol	-	-	-	0,6	20,41	1175	0,7	20,40	1175	0,1	20,42	1176	1169
C ₁₀ H ₁₈ O	α-Terpineol	-	-	-	0,2	21,33	1200	-	-	-	t	21,34	1200	1189
C ₁₀ H ₁₆ O	(E)-Carveol	1,1	21,84	1214	1,0	21,88	1215	0,1	21,92	1216	0,7	21,86	1215	1217
C ₁₂ H ₂₀ O ₂	Acetato de isobornil	-	-	-	-	-	-	0,3	24,35	1286	-	-	-	1286
C ₁₅ H ₂₄	α-Copaeno	0,1	27,37	1375	-	-	-	0,2	27,38	1375	0,2	27,37	1375	1377
C ₁₅ H ₂₄	β-Burboneno	0,1	27,63	1383	-	-	-	-	-	-	0,1	27,64	1383	1388
C ₁₅ H ₂₄	β-Cubebeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	27,78	1387	1388
C ₁₅ H ₂₄	β-Elemeno	-	-	-	-	-	-	0,2	27,84	1389	0,2	27,83	1389	1391
C ₁₅ H ₂₄	(E)-Cariofileno	2,5	28,79	1419	1,0	28,79	1419	3,1	28,79	1419	4,8	28,80	1419	1419
C ₁₅ H ₂₄	β-Copaeno	-	-	-	-	-	-	0,1	29,12	1429	0,2	29,12	1429	1432
C ₁₅ H ₂₄	α-Humuleno	-	-	-	0,1	29,93	1455	0,6	29,93	1455	0,8	29,94	1456	1455
C ₁₅ H ₂₄	(E)- β-Farneseno	0,2	29,86	1453	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1457
C ₁₅ H ₂₄	alo-Aromadendreno	0,1	30,05	1459	-	-	-	0,2	30,06	1459	0,2	30,07	1460	1460
C ₁₅ H ₂₄	γ-Muroloeno	t	30,52	1474	-	-	-	-	-	-	0,1	30,55	1475	1480
C ₁₅ H ₂₄	Germacreno D	3,2	30,74	1481	1,5	30,73	1481	5,1	30,74	1481	7,8	30,74	1481	1485
C ₁₅ H ₂₄	Biciclogermacreno	0,1	31,18	1495	-	-	-	0,1	31,18	1495	0,1	31,17	1495	1500
C ₁₅ H ₂₄	α-Muroloeno	-	-	-	-	-	-	0,5	31,28	1498	0,1	31,26	1498	1500
C ₁₅ H ₂₄	Germacreno A	0,6	31,54	1507	0,3	31,54	1507	0,9	31,55	1507	1,3	31,55	1506	1509
C ₁₅ H ₂₆ O	Cubebol	-	-	-	0,5	31,85	1517	1,3	31,85	1517	1,2	31,85	1517	1515
C ₁₅ H ₂₄	Germacreno B	1,9	33,08	1559	1,0	33,08	1559	3,8	33,08	1559	4,7	33,09	1559	1561
C ₁₅ H ₂₆ O	(E)-nerolidol	0,3	33,22	1564	-	-	-	-	-	-	0,1	33,26	1565	1563
C ₁₅ H ₂₆ O	Germacreno D-4-ol	0,2	33,67	1579	1,2	33,67	1579	3,5	33,66	1578	0,5	33,64	1577	1576
C ₁₅ H ₂₄ O	Óxido de cariofileno	2,1	33,81	1583	0,8	33,82	1584	0,2	33,81	1583	0,4	33,81	1583	1583
C ₁₅ H ₂₆ O	1,10-Di-epi-cubenol	-	-	-	-	-	-	0,1	34,78	1617	0,1	34,63	1612	1619
C ₁₅ H ₂₆ O	τ-Muurolool	-	-	-	-	-	-	0,6	35,62	1647	-	-	-	1642
C ₁₅ H ₂₆ O	α-Cadinol	-	-	-	-	-	-	0,8	35,94	1658	0,1	35,95	1658	1654
Somatório %		87,8			91,2			97,2			93,4			

% = Porcentagem relativa; **Tr** = Tempo de retenção; **IRcal** = Índice de retenção calculado; **IRref** =

Índice de retenção de referência; t = traço (menor que 0,06 %).



3.2 Manuscrito 2

BARROS, F. M. C.; ZAMBARDA, E. O.; POZZATTI, P.; ALVES, S. H.; MALLMANN, C. A.; HEINZMANN, B. M. Seasonal Variability and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). Submetido à Planta Medica.



**Seasonal Variability and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of
Lippia alba (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae)**

Journal:	<i>Planta Medica</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Original Papers
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	de Barros, Francisco; Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Farmácia Industrial Zambarda, Eduardo; Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Farmácia Industrial Pozzatti, Patricia; Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Microbiologia Alves, Sydney; Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Microbiologia Mallmann, Carlos; Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva Heinzmann, Berta; Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Farmácia Industrial
Keywords:	GC < Natural Products Analysis, Sesquiterpenes < Isoprenoids < Natural Products Classes, In vitro Methods < Pharmacology, Antimicrobial < Molecular Targets and Activities, GC-MS < Natural Products Analysis, Monoterpenes < Isoprenoids < Natural Products Classes, Higher Plants < Sources of Compounds and Bioactivity



1
2 Original Paper
3
4
5
6
7
8

9 **Seasonal Variability and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Lippia alba* (Mill.) N.**

10
11 **E. Brown (Verbenaceae)**
12
13
14
15
16
17

18 Francisco Maikon Corrêa de Barros¹, Eduardo de Oliveira Zambarda², Patrícia Pozzatti¹, Sydney
19 Hartz Alves^{1,3}, Carlos Augusto Mallmann⁴, Berta Maria Heinzmann^{1,2}
20
21
22
23
24
25

26 **Affiliation**

27
28 ¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde,
29 Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil
30
31

32
33 ²Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de
34 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil
35
36

37
38 ³Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade
39 Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil
40
41

42
43 ⁴Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade
44 Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil
45
46
47
48
49
50
51

52 **Correspondence**

53
54 Prof.^a Dra. Berta Maria Heinzmann. Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências
55 da Saúde, Departamento de Farmácia Industrial, Prédio 26, Campus Universitário, BR-97105-
56 900 Santa Maria, RS, Brazil. E-mail: berta.heinzmann@gmail.com Phone: +55 55 3220 9366
57
58
59 Fax: +55 55 3220 8248
60

1

Abstract

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown is a medicinal plant popularly known as “salvia-do-Rio-Grande” in the southern region of Brazil. It is used in traditional medicine for the treatment of several illnesses, including some of infective etiology. The aim of this study was to investigate the influence of the seasonal variability of the essential oils of this species on antimicrobial activity. The leaves were obtained from cultivated plants, collected in each season of the year. The essential oils were extracted by hydrodistillation and analyzed by GC-MS, using Kovats’ retention indexes and MS-fragmentation for identification of the compounds. Antimicrobial activity was determined by the broth microdilution method against strains of four bacterias, three yeasts, and one alga. Yield, chemical composition, and antimicrobial activity of the essential oils varied in accordance with the season of the year.

Key words

Lippia alba, Verbenaceae, essential oil, seasonal variability, antimicrobial activity.

Abbreviations:

MIC: minimum inhibitory concentration

MBC: minimum bactericidal concentration

MFC: minimum fungicidal concentration

CFU: colony forming unit

Introduction

Qualitative and quantitative variations in composition of essential oils are frequent in plants, including the species of the genus *Lippia* [1]. Several studies have reported antimicrobial activity of essential oils obtained from these plants [1], [2], which reflects the trend of the last decades to search for new compounds that act as anti-infection agents [3]. Because the collecting season can affect the chemical variability of essential oils, presumably alterations in their biological activity might occur as well.

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) is a medicinal plant known as “salvia-do-Rio-Grande” in Rio Grande do Sul, the southernmost state of Brazil, which is in the temperate zone of the country. This species is being incorporated into the Brazilian Pharmacopeia, and is one of the medicinal plants considered to be included in the phytotherapy program of Brazil’s National Health System. An infusion and/or decoction of its leaves are commonly used in traditional medicine, and some applications are related to microbial infections including gastrointestinal disorders, diarrhea, dysentery, and cutaneous and respiratory diseases [4].

Until now, only disconnected studies on variability [5], [6], [7], [8], [9] and antimicrobial activity [10], [11], [12], [13] of the essential oils of *L. alba* have been performed. The aim of the present study was to investigate the influence of seasonal variability on the antimicrobial activity of essential oils from the leaves of cultivated plants of *Lippia alba*, in order to determine the best time of year for harvest and extraction of plant material, in terms of activity optimization.

Materials and methods

Plant material

1
2 *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown was cultivated in São Luiz Gonzaga, state of Rio Grande do Sul,
3
4 Brazil. The aerial parts of the plant were collected in 2006 in the middle period (January, April,
5
6 July, and October) of each season. The plant material was identified by the botanist Dr. Gilberto
7
8 Dolejal Zanetti, Department of Industrial Pharmacy, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).
9
10 A voucher specimen (SMDB No. 10050) was deposited in the herbarium of the Department of
11
12 Biology, UFSM.
13
14
15
16
17

18 **Essential oil extraction and analysis**

19
20 The essential oils were obtained from fresh leaves of the plant by hydrodistillation, using a
21
22 Clevenger type apparatus for 2h [14]. Essential oil samples were stored at -20°C in amber glass
23
24 bottles until GC-MS analysis and antimicrobial evaluation. The yield of the essential oils was
25
26 calculated as a percentage of volume and weight (% v/w).
27
28
29
30
31
32

33 GC-MS TIC analysis was performed using an Agilent-6890 gas chromatograph coupled with an
34
35 Agilent 5973 mass selective detector, under the following conditions: HP5-MS column (5%-phenyl
36
37 - 95%-methylsiloxane, 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm); EI-MS: 70 eV; Operating conditions: split inlet
38
39 1:100; temperature program, 40-260°C; 40°C for 4 min; ramp rate, 4°C/min; carrier gas He: flow
40
41 rate, 1 mL/min; injector and detector temperature, 220°C; interface temperature 250°C; Databank
42
43 NIST, 1998.
44
45
46
47
48
49

50 The constituents of the essential oils were identified by comparison of the mass spectra with a mass
51
52 spectral library (NIST, 1998), and the Kovats retention index with literature data [15].
53
54
55

56 **Antimicrobial activity**

57
58 The microorganisms used in the test are listed in Table 2. The antimicrobial activity of the essential
59
60 oils was determined by the broth microdilution method [16], [17]. Initially, the essential oils were

1
2 dissolved in methanol, in order to obtain stock solutions of the concentration of 640 mg/mL. The
3
4 stock solutions were diluted (1:100) in the appropriate medium, Muller-Hinton broth for bacterial
5
6 strains, and buffered RPMI 1640 broth for yeasts. From these, serial dilutions were prepared in 96-
7
8 well microtiter trays over the range of 100 to 6400 g/mL.
9
10

11
12
13 Bacterial strains and yeasts were grown in Muller-Hinton (24 h / 35 °C) and Sabouraud dextrose
14
15 agar (48 h / 35 °C), respectively. Bacterial suspensions of 0.5 McFarland standard turbidity (1×10^8
16
17 CFU/mL) were prepared by dilution with saline, and later diluted (1:100) with Muller-Hinton broth
18
19 (1×10^6 CFU/mL). Aliquots of 10^{-1} (1×10^4 CFU/mL) of inoculum were added to each well of the
20
21 microtiter tray already containing 200^{-1} of the medium plus different concentrations of the
22
23 essential oils. In parallel, yeast suspensions were prepared by dilution with 0.85% NaCl solution
24
25 and adjusted to 0.5 McFarland standard turbidity (1×10^6 to 5×10^6 CFU/mL). These suspensions
26
27 were diluted with sterilized water (1:50) and buffered RPMI 1640 broth (1:20), resulting in $1.0 \times$
28
29 10^3 to 5.0×10^3 CFU/mL. 100 μ L of the inoculum was added to each well of the microtiter plate
30
31 already containing 100 μ L of the essential oil solution. The microplates with bacterial strains were
32
33 incubated for 24 h at 35°C. Those with yeasts were incubated for 48 h at 35°C. The same tests were
34
35 performed simultaneously for inoculum growth and sterility control. The final concentration of
36
37 methanol did not exceed 1% and did not affect the growth of the microorganisms. Itraconazole and
38
39 ciprofloxacin were used as positive controls. The alga *Prototeca zopfii* was assayed in the same way
40
41 as described for yeasts.
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51
52 The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined as the lowest concentration of
53
54 essential oil that completely inhibited visible growth of microorganisms. To determine the
55
56 minimum bactericidal and fungicidal concentration (MBC/MFC), 10^{-1} L broth was taken from each
57
58 well without microbial growth and inoculated in Muller-Hinton and Sabouraud dextrose agar,
59
60 respectively. The plates were incubated for 48 h at 35°C until they were read. The MBC and MFC

1
2 were defined as the lowest concentration of the essential oil capable of killing the inoculum.
3
4

5 6 7 **Results and Discussion** 8

9
10
11 Semi-quantitative and qualitative results of the essential oil analysis are shown in Table 1.

12
13 The essential oil was composed mainly of monoterpenoids (69.38 – 73.93%) and sesquiterpenoids
14 (21.09 – 24.13%) (Table 1). Monoterpenoids were the main constituents in previous studies of this
15 species [5], [8], [9]. In total, 34 substances were detected in our assays. The largest number of
16 compounds was found in summer, the season when the highest yield of essential oil was obtained.
17
18 Silva *et al.* [9] assumed that this might be a consequence of greater stress caused by the heat at this
19 season.
20
21
22
23
24
25
26
27

28
29
30 The yield of the essential oils of *Lippia alba* ranged from 0.34% to 0.62%, in accordance with
31 literature data [5], [8], [9]. These authors reported that lower yields were obtained from plants
32 collected in winter, and the largest amounts were obtained during the phase of vegetative growth of
33 the plant. Surprisingly, in spring, when the leaves and sprouts are young and therefore more
34 susceptible to predators, the yield was relatively low. Additionally, the oil obtained in spring did not
35 inhibit growth of microorganisms (Table 2). This suggests that the essential oil constituents are not
36 involved in plant defense against these organisms in *L. alba*.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

49
50 The composition of the essential oils showed significant differences, depending on the time of year
51 (Table 1). In contrast to other reports [5], [8], [9], the major constituents (> 15%) did not remain
52 constant. Two groups of major constituents were found: one consisting of 1,8-cineole and camphor
53 (summer and spring); and the other of 1,8-cineole, camphor, and linalool (autumn and winter).
54
55
56
57
58
59
60

Many factors can contribute to the variability of essential oils of *L. alba*. Among these, the different

1 parts of the branch [6], season and harvest schedules [5], [6], [7], [9], genetic factors [8], and
2 extraction methods [18] may all influence the composition of the essential oil. In the future, the
3 understanding of these aspects will enable the adoption of standardized processes for cultivating the
4 plant and obtaining the derived products.
5
6
7
8
9

10
11
12
13
14 The results for antimicrobial activity are presented in Table 2. With the exception of *Pseudomonas*
15 *aeruginosa*, all other microorganisms tested were susceptible to the essential oils of *L. alba* from at
16 least one season. The most sensitive yeast was *Saccharomyces cerevisiae*, with MIC and MFC of
17 800 g/mL for the oil obtained in January. The most susceptible bacterial strains were
18 *Staphylococcus aureus* for the oils obtained in April and July, and *Klebsiella pneumoniae* for the oil
19 extracted in July. The results in Table 2 are in accordance with literature data, which report yeast
20 and fungi as being more sensitive than bacteria [19], and Gram-negative bacteria as more resistant
21 than Gram-positive. According to Holley and Patel [19], sterols present in membranes of yeasts and
22 fungi but absent from prokaryotic cells do not confer resistance against antimicrobials. On the other
23 hand, the greater resistance of Gram-negative bacteria to essential oils appears to result in part from
24 the greater complexity of the double-membrane cell envelope of these organisms, in contrast to the
25 single-membrane glycoprotein/techoic acid, or membrane-glycoprotein/ β -glucan-based structures
26 of Gram-positive bacteria and yeasts, respectively [19], [20], [21]. This could explain, at least in
27 part, the resistance of *P. aeruginosa* to most essential oils [22]. Besides differences at the
28 cytoplasmic membrane-glycoprotein interface as well as greater physicochemical complexity of the
29 Gram-negative cell wall, metabolic differences may also be important for the resistance or
30 sensitivity of microorganisms to essential oils [19].
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56

57 The degree of activity of the essential oils of *L. alba* ranges from weak to moderate [23], [24]. In
58 some cases the MIC was equivalent to the MBC/MFC, indicating that the observed effects are a
59 consequence of the microbicidal action of the essential oils. Although the MIC values are not
60

1
2 excellent for clinical use, the broad spectrum of action demonstrated is considerable in view of the
3
4 global problem of resistance to antimicrobial substances [25]. Some authors have demonstrated that
5
6 essential oils can influence the effectiveness of some antibiotics [26]. Synergic effects, in this case,
7
8 might be an interesting alternative for combatting microbial resistance in the future.
9

10
11
12 As seen in Table 2, seasonality influenced the antimicrobial activity. The evidence showed that this
13
14 aspect was correlated with the chemical composition of essential oils (Table 1), and certain
15
16 constituents seemed to have an important role in these results. The inefficiency of the essential oil
17
18 obtained in October (Table 2), for example, could be related to the absence of some constituents
19
20 occurring in other seasons (Table 1), such as linalool, pinocarvone, limonene, myrcene, and β -
21
22 pinene. Various components of the essential oil of *L. alba* have had their antimicrobial activity
23
24 described as isolated substances [27], [28], [29]. However, the results presented are contradictory.
25
26 These contradictions can be explained by the different variables that can influence these results,
27
28 e.g., the strain, the method, the growth medium, the pH of the compound, and its concentration [3].
29
30 Nevertheless, the literature shows general information that could contribute to explain our results.
31
32 Delaquis *et al.* [30], for example, found that fractions enriched in C6-C10 alcohols and aldehydes
33
34 were particularly active against Gram-positive bacteria. As Table 1 shows, linalool occurred in oils
35
36 obtained in summer, autumn, and winter, which all showed antimicrobial activity; but this
37
38 compound was absent in the oil obtained in spring, which was inactive. These results suggest that
39
40 linalool may be one of the substances responsible for the antimicrobial activity observed.
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51
52 The higher virulence of *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* to human beings allows
53
54 us to postulate that the winter is the best harvest season, to maximize antimicrobial activity,
55
56 although we observed the smallest yields in winter.
57
58
59
60

Essential oils normally have many components, and it is likely that their action involves several

1
2 targets in the microbial cell. The degradation of the cell wall, the damage to cytoplasmic membrane
3
4 and membrane proteins, the leakage of cell content, the coagulation of cytoplasm, and the depletion
5
6 of the proton motive force are possible mechanisms of action [21]. In this regard, some authors have
7
8 suggested that the hydrophobicity of essential oils, or more specifically their capacity to interfere
9
10 with structures of the microbial cell membrane, is the main reason for their antimicrobial activity
11
12 [19], [20], [21].
13
14
15
16
17

18 The antibacterial and antifungal potentials were reached at different times, in July and January
19
20 respectively (Table 2). With regard to the differences between the microorganisms, it seems that
21
22 higher concentrations of the active constituents occurred in the cited months. Moreover, the
23
24 presence of the same major constituents in January and October, as well as in April and July (Table
25
26 1), indicates that the less-abundant constituents must be considered to be responsible for the
27
28 antimicrobial activity as well. According to Burt [21], synergic or antagonistic effects between the
29
30 constituents of essential oils can also contribute to observed results.
31
32
33
34
35
36

37 Although antimicrobial activity of the essential oils of the leaves of *L. alba* has been reported
38
39 previously [10], [11], [12], [13], the authors did not describe the correlations between the harvest
40
41 time, composition, and antimicrobial activity. In addition, most of them used leaves from wild
42
43 plants, which are influenced by many and variable factors, such as growth conditions, climate, soil
44
45 quality, and insolation, among others. General rules for harvesting medicinal plants were developed
46
47 in Europe. There, for plants which contain essential oils, spring is often considered the ideal season
48
49 for collecting the plant material. However, in our study, the essential oil of *L. alba* harvested in
50
51 spring was inactive against the tested microorganisms. This result indicates that this general rule
52
53 cannot be used without complementary studies. The different aspects involved in the culture,
54
55 genetic improvement, harvesting, and the chemical constituents and their correlations with the
56
57 biological activity of Brazilian native plants must be determined for each individual species, in
58
59
60

1
2 order to improve the pharmacological activity of the phytomedicines produced from it.
3
4
5

6 7 **Acknowledgements**

8
9 To the Brazilian Pharmacopeia for literature support, to Dr. Gilberto Dolejal Zanetti for the
10 identification of the species, and to CAPES and CNPq for financial support.
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

- ¹ Viljoen AM, Subramoney S, Vuuren SF, Baser KHC, Demirci B. The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. J Ethnopharmacol 2005; 96: 271-7.
- ² Bassole IHN, Ouattara AS, Nebie R, Ouattara CAT, Kabore ZI, Traorea SA. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. Phytochem 2003; 62: 209-12.
- ³ Ríos JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. J Ethnopharmacol 2005; 100: 80-4.
- ⁴ Pascual ME, Slowing K, Carretero ME, Mata DS, Villar A. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. J Ethnopharmacol 2001; 76: 201-14.
- ⁵ Atti-Serafini L, Pansera MR, Atti-Santos AC, Rossato M, Pauletti GF, Rota LD et al. Variation in essential oil yield and composition of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. grown in southern Brazil. Rev Bras Pl Med 2002; 4: 72-4.
- ⁶ Castro DM, Ming LC, Marques MOM. Composição fitoquímica dos óleos essenciais de folhas de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. em diferentes épocas de colheita e partes do ramo. Rev Bras Pl Med 2002; 4: 75-9.
- ⁷ Nagao EO, Innecco R, Mattos SH, Medeiros Filho S, Marco CA. Efeito do horário de colheita sobre o teor e constituintes majoritários de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br., quimiotipo citral-limoneno. Rev Ciênc Agron 2004; 35: 355-60.
- ⁸ Tavares ES, Julião LS, Lopes D, Bizzo HR, Lage CLS, Leitão SG. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. Rev Bras Farmacogn 2005; 15: 1-5.
- ⁹ Silva NA, Oliveira FF, Costa LCB, Bizzo HR, Oliveira RA. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. Rev Bras Pl

1
2 Med 2006; 8: 52-5.

3
4 ¹⁰ *Alea JAP, Luis AGO, Pérez AR, Jorge MR, Baluja R.* Composición y propiedades antibacterianas
5
6 del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. Rev Cubana Farm 1996; 30: 0-0. ISSN
7
8 0034-7515.

9
10
11 ¹¹ *Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C.* Anti-*Candida* activity of
12
13 Brazilian medicinal plants. J Ethnopharmacol 2005; 97: 305-11.

14
15
16 ¹² *Oliveira DR, Leitão GG, Santos SS, Bizzo HR, Lopes D, Alviano CS et al.* Ethnopharmacological
17
18 study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. J Ethnopharmacol 2006; 108: 103-8.

19
20
21 ¹³ *Duarte MCT, Leme EE, Delarmelina C, Soares AA, Figueira GM, Sartoratto A.* Activity of
22
23 essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. J Ethnopharmacol 2007; 111:
24
25 197-201.

26
27
28 ¹⁴ Farmacopéia Brasileira, 4th Edition. São Paulo: Atheneu; 2000.

29
30
31 ¹⁵ *Adams RP.* Identification of essential oil components by gas chromatography/quadupole mass
32
33 spectroscopy. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, Illinois; 2001: 1-456.

34
35
36 ¹⁶ National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial
37
38 susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A4, 5th edition.
39
40 Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 1997.

41
42
43 ¹⁷ National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution
44
45 antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard M27-A2, 2nd edition. Wayne,
46
47 Pennsylvania: NCCLS, 2002.

48
49
50 ¹⁸ *Stashenko EE, Jaramillo BE, Martinez JR.* Comparison of different extraction methods for
51
52 analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, grown in Colombia,
53
54 and evaluation of its in vitro antioxidant activity. J Chromatogr A 2004; 1025: 93-103.

55
56
57 ¹⁹ *Holley RA, Patel D.* Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential
58
59 oils and smoke antimicrobials. Food Microbiol 2005; 22: 273-92.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- ²⁰ *Sikkema J, Bont JAM, Poolman B.* Mechanisms of membrane toxicity hydrocarbons. *Microbiol Rev* 1995; 59: 201-22.
- ²¹ *Burt S.* Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int J Food Microbiol* 2004; 94: 223-53.
- ²² *Mesaros N, Nordmann P, Plésia P, Roussel-delvallez M, Van EJ, Glupczynski Y et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 560-78.
- ²³ *Aliyiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB.* Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 4168-70.
- ²⁴ *Sartorato A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG.* Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol* 2004; 35: 275-80.
- ²⁵ *Neely AN, Holder IA.* Antimicrobial resistance. *Burns* 1999; 25: 17-24.
- ²⁶ *Oliveira RAG, Lima EO, Vieira WL, Freire KRL, Trajano VN, Lima OI et al.* Estudo da interferência dos óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Rev Bras Farmacogn* 2006; 16: 77-82.
- ²⁷ *Dorman HJD, Deans SG.* Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 2000; 88: 308-16.
- ²⁸ *Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H.* Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 565-73.
- ²⁹ *Hammer KA, Carson CF, Riley TV.* Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J Appl Microbiol* 2003; 95: 853-60.
- ³⁰ *Delaquis PJ, Stanich K, Girard B, Mazza G.* Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int J Food Microbiol* 2002; 74: 101– 9.

1
2 **Table Legends**
3
4
5

6
7 **Table 1:** Chemical constituents of the essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, from plants
8
9 harvested in the four seasons of 2006.
10

11
12
13
14 **Table 2:** Antimicrobial activity of essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown from plants
15
16 harvested in the four seasons of 2006.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Table 1:

Formula	Constituent	January (Summer)			April (Autumn)			July (Winter)			October (Spring)					
		Yield (% v/w)			0.59			0.62			0.34			0.43		
		%	Rt	RI cal	%	Rt	RI cal	%	Rt	RI cal	%	Rt	RI cal	RI ref		
C ₁₀ H ₁₆	α -Pinene	0.61	10.73	930	0.34	10.83	941	0.35	10.82	941	0.86	10.47	958	939		
C ₁₀ H ₁₆	Camphene	1.42	11.40	947	1.10	11.40	955	1.06	11.40	955	2.52	11.03	969	954		
C ₁₀ H ₁₆	Sabinene	4.37	12.40	971	3.10	12.46	981	2.66	12.46	981	4.45	12.18	993	975		
C ₁₀ H ₁₆	β -Pinene	0.40	12.54	975	0.39	12.53	983	0.38	12.53	983	-	-	-	979		
C ₁₀ H ₁₆	Myrcene	2.11	13.16	990	0.70	13.29	1001	0.49	13.27	1001	-	-	-	991		
C ₁₀ H ₁₆	Limonene	2.88	14.71	1028	1.38	14.70	1037	1.09	14.70	1037	-	-	-	1029		
C ₁₀ H ₁₈ O	1,8-cineole	22.98	14.84	1032	23.27	14.79	1039	21.35	14.79	1039	32.08	14.39	1042	1031		
C ₁₀ H ₁₈ O	Z-Sabinene hydrate	0.21	16.49	1073	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1070		
C ₁₀ H ₁₆	Isoterpinolene	0.33	16.96	1085	-	-	-	0.16	17.07	1096	-	-	-	1088		
C ₁₀ H ₁₈ O	Linalool	6.89	17.69	1103	21.71	17.66	1111	29.12	17.67	1111	-	-	-	1097		
C ₁₀ H ₁₆ O	Camphor	22.62	19.40	1148	21.17	19.20	1151	15.45	19.20	1151	29.58	18.83	1148	1146		
C ₁₀ H ₁₄ O	Pinocarvone	1.33	19.97	1164	0.77	19.92	1170	0.57	19.91	1169	-	-	-	1165		
C ₁₀ H ₁₈ O	Borneol	2.45	20.38	1174	-	-	-	-	-	-	3.16	19.85	1174	1169		
C ₁₀ H ₁₈ O	α -Terpineol	0.53	21.31	1199	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1189		
C ₁₀ H ₁₄ O	Verbenone	0.25	21.74	1211	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1205		
C ₁₂ H ₂₀ O ₂	Isobornyl acetate	0.30	24.34	1285	-	-	-	-	-	-	0.37	23.95	1289	1286		
C ₁₅ H ₂₄	α -Copaene	0.46	27.35	1374	-	-	-	-	-	-	0.40	26.85	1377	1377		
C ₁₅ H ₂₄	β -Cubebene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.07	27.33	1392	1388		
C ₁₅ H ₂₄	β -Elemene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.16	27.40	1394	1391		
C ₁₅ H ₂₄	α -Gurjunene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.09	27.91	1410	1410		
C ₁₅ H ₂₄	<i>E</i> -Caryophyllene	2.86	28.78	1418	3.75	28.66	1425	4.48	28.65	1425	3.75	28.23	1421	1419		
C ₁₅ H ₂₄	α -Humulene	0.51	29.92	1455	0.17	29.73	1459	-	-	-	0.37	29.32	1456	1455		
C ₁₅ H ₂₄	<i>E</i> - β -Farnesene	-	-	-	-	-	-	0.32	29.72	1459	-	-	-	1457		
C ₁₅ H ₂₄	<i>allo</i> -Aromadendrene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.06	29.54	1463	1460		
C ₁₅ H ₂₄	γ -Muurolole	-	-	-	-	-	-	0.05	30.42	1481	0.09	30.03	1479	1480		
C ₁₅ H ₂₄	Germacrene D	4.62	30.72	1480	5.78	30.58	1486	6.78	30.58	1486	3.88	30.19	1485	1485		
C ₁₅ H ₂₄	Bicyclogermacrene	0.20	31.17	1495	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1500		
C ₁₅ H ₂₄	α -Muurolole	0.73	31.25	1497	-	-	-	0.46	31.15	1505	0.62	30.78	1504	1500		
C ₁₅ H ₂₄	Germacrene A	0.41	31.54	1507	0.59	31.33	1511	0.78	31.32	1511	0.50	30.94	1510	1509		
C ₁₅ H ₂₄	δ -Cadinene	1.36	31.84	1517	0.65	31.84	1528	0.42	31.85	1529	1.16	31.47	1528	1523		
C ₁₅ H ₂₄	Germacrene B	3.53	33.07	1559	4.82	32.85	1562	5.37	32.85	1562	4.80	32.44	1561	1561		
C ₁₅ H ₂₆ O	Germacrene D-4-ol	7.11	33.65	1578	5.33	33.45	1583	4.92	33.45	1583	7.14	33.10	1584	1576		
C ₁₅ H ₂₆ O	τ -Muurolol	1.12	35.60	1646	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1642		
C ₁₅ H ₂₆ O	α -Cadinol	1.16	35.93	1658	-	-	-	-	-	-	1.04	35.09	1655	1654		
Monoterpenoids																
Hydrocarbonated		12.12			7.01			6.19			7.83					
Oxygenated		57.26			66.92			66.49			65.19					
Sesquiterpenoids																
Hydrocarbonated		14.68			15.76			18.66			15.95					
Oxygenated		9.39			5.33			4.92			8.18					
Others		0.30			-			-			0.37					
Total		93.75			95.02			96.26			97.15					

/: relative percentage; Rt: retention time; RI cal: calculated Kovats retention index; RI ref:

reference Kovats retention index.

Table 2:

Microorganism	Source	January (Summer)		April (Autumn)		July (Winter)		October (Spring)		Ciprof	Itrac
		MIC	MBC/MFC	MIC	MBC/MFC	MIC	MBC/MFC	MIC	MBC/MFC	MIC	MIC
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25293	1600	-	800	1600	800	1600	>6400	-	1.00	NT
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	>6400	-	>6400	-	6400	6400	>6400	-	1.00	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	>6400	-	>6400	-	>6400	-	>6400	-	2.00	NT
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031	>1600	-	1600	3200	1600	1600	>6400	-	0.50	NT
<i>Candida albicans</i>	ATCC 44773	3200	3200	>3200	-	>3200	-	>6400	-	NT	0.06
<i>Candida glabrata</i>	Ci	3200	3200	>3200	-	>3200	-	>6400	-	NT	0.25
<i>Prototheca zopfii</i>	Ci	>3200	-	>3200	-	>3200	-	>6400	-	NT	4.00
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 28952	800	800	3200	3200	3200	3200	>6400	-	NT	0.06

MIC: minimum inhibitory concentration (g/mL); MBC: minimum bactericidal concentration

(g/mL); MFC: minimum fungicidal concentration (g/mL); ATCC: American Type Culture

Collection; Ci: clinical isolate; Ciprof: ciprofloxacin; Itrac: itraconazole; -: no activity; NT: not

tested.

3.3 Manuscrito 3

BARROS, F. M. C.; ZAMBARDA, E. O.; POZZATTI, P.; ALVES, S. H.; MALLMANN, C. A.; HEINZMANN, B. M. Bio-guided fractionation of the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). Submetido à Journal of Ethnopharmacology.

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Ethnopharmacology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: BIO-GUIDED FRACTIONATION AND OF THE ESSENTIAL OIL OF *Lippia alba* (MILL.) N. E. BROWN
(VERBENACEAE)

Article Type: Full Length Article

Corresponding Author: Prof. Berta Maria Heinzmann, Dr.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Santa Maria

First Author: Francisco Maikon C Barros, MSc Student

Order of Authors: Francisco Maikon C Barros, MSc Student; Eduardo O Zambarda; Patricia Pozzatti, MSc;
Sydney H Alves, Prof., Dr.; Carlos A Mallmann, Prof., Dr.; Berta Maria Heinzmann, Dr.

**BIO-GUIDED FRACTIONATION AND OF THE ESSENTIAL OIL OF *Lippia alba*
(MILL.) N. E. BROWN (VERBENACEAE)**

F. M. C. Barros^a, E. O. Zambarda^b, P. Pozzatti^a, S. H. Alves^{a, c}, C. A. Mallmann^d, B. M.
Heinzmann^{a, b, *}

^a*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.*

^b*Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal
de Santa Maria, Prédio 26, Campus Universitário, CEP- 97105-900, Santa Maria, Rio
Grande do Sul, Brazil.*

^c*Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade
Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.*

^d*Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais,
Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.*

*Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 9366; fax: +55 55 3220 8248.

E-mail address: berta.heinzmann@gmail.com (B. M. Heinzmann).

Abstract

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) is a medicinal plant rich in essential oil, which is popularly used in Brazil for the treatment of several illnesses of infectious etiology. This paper describes the evaluation of antimicrobial activity and bio-guided fractionation of the essential oil of *L. alba*, in order to isolate and identify its active compounds. The essential oil was obtained from fresh leaves of the plant by hydrodistillation and identified by GC-MS. After fractionation of the essential oil by column chromatography, the isolated compounds were identified as germacrene D-4-ol and linalool by spectroscopic analysis (GC-MS, ¹H RMN, ¹³C RMN, DEPT-135, COSY and HETCOR). The antimicrobial activity of the essential oil and its fractions and isolated compounds was determined by the broth microdilution method. Germacrene D-4-ol showed antimicrobial activity against *S. cerevisiae*, *P. zopfii* and *S. aureus*, whereas linalool was inactive.

Keywords: *Lippia alba*; Essential oil; Germacrene D-4-ol; Linalool; Antimicrobial activity.

1. Introduction

The global problem of resistance to antimicrobials and the emergence of new pathogenic microorganisms has led many researchers to emphasize the need to develop new agents to combat microbial infections (Murphy and Kavanagh, 1999; Neely and Holder, 1999; Bax et al., 2000).

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) (Syn: *Lantana alba* Mill.) is one of the best-known Brazilian plants used in traditional medicine. Its leaves and roots are prepared as an infusion, decoction, bath or syrup, and used for the treatment of various ailments related to microbial infections, including diarrhea and dysentery, and skin and respiratory diseases (Pascual et al., 2001; Di Stasi et al., 2002; Barros et al., 2007; Hennebelle et al., 2008). This species is being incorporated into the Brazilian Pharmacopeia, and is one of the medicinal plants under consideration for inclusion in the phytotherapy program of Brazil's National Health System.

The *in vitro* antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia alba* partly explains the medicinal use of this plant (Souza et al., 2005; Duarte et al., 2005; Oliveira et al., 2006; Duarte et al., 2007; Vera et al., 2007). Many authors attribute this activity to the major compounds of the essential oil, especially the oxygenated monoterpenoids (Oliveira et al., 2006). The present study describes the evaluation of the antimicrobial activity and the fractionation of the essential oil, in order to isolate and identify its active compounds.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The aerial parts of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, cultivated in São Luiz Gonzaga, state of Rio Grande do Sul, Brazil, were collected in January 2006. The plant material was identified by the botanist Dr. Gilberto Dolejal Zanetti, Department of Industrial Pharmacy,

UFSM. A voucher specimen (SMDB No. 10 050) was deposited in the herbarium of the Department of Biology, UFSM.

2.2. Essential oil extraction

The essential oil was obtained from fresh leaves by hydrodistillation using a Clevenger type apparatus for 2 h (Farmacopéia Brasileira, 2000) and then stored at -4 °C in amber glass bottles. Its yield was calculated as a percentage ratio (% w/w).

2.3. Fractionation and purification

The essential oil (5.96 g) was fractionated by column chromatography using silica gel 60 (40.5 x 3.2 cm; 70-230 mesh, Merck) with hexane-acetone (95:5) as the eluent. The 32 subfractions obtained were monitored by TLC and pooled according to their chromatographic profiles. Their yields were expressed as a proportion of the sample placed in the column. The fractions obtained were analyzed by GC-MS, and their antimicrobial activity was evaluated. Subsequently, fraction 4 (0.78 g) was selected for isolation and purification of the constituents. This fraction was chromatographed on silica gel 60 (55.5 x 2 cm) and eluted with hexane-acetone (95:5). The last column furnished 32.0 and 53.3 mg of substances 1 and 2. The purified compounds were analyzed by GC-MS and 2D NMR, and their antimicrobial activity was evaluated.

2.4. Spectroscopic analysis

The constituents of the essential oil and fractions were identified by comparison of the mass spectra with a mass-spectrum library (NIST, 1998), and Kovats retention indexes with literature data (Adams, 2001).

GC-MS TIC analysis was performed using an Agilent-6890 gas chromatograph coupled with an Agilent 5973 mass selective detector, under the following conditions: HP5-MS column (5%-phenyl-95%-methylsiloxane, 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m); EI-MS: 70 eV; Operating conditions: split inlet 1:100; temperature program, 40-260°C; 40°C for 4 min; ramp rate, 4°C/min; carrier gas He: flow rate, 1 mL/min.; injector and detector temperature, 220°C; interface temperature 250°C; Databank, NIST, 1998.

NMR spectra were recorded on a Bruker DPX 300 FT-NMR at 400 MHz for ^1H and 100 MHz for ^{13}C in CDCl_3 with TMS as the internal standard.

Germacrene D-4-ol (1): R_f 0.53 (silica gel F_{254} ; hexane-acetone (95:5); Three developments; detection: anisaldehyde- H_2SO_4 ; Rt (GC): 33.67 min.; EI-MS m/z (%): 222 $[\text{M}]^+$ (1), 207 (12), 204 (12), 189 (7), 161 (35), 133 (8), 123 (27), 105 (20), 91 (27), 81 (100), 79 (16), 67 (19), 55 (17), 43 (49), 41 (32); for ^1H and ^{13}C -NMR data see Table 3.

Linalool (2): R_f 0.22 (silica gel F_{254} ; hexane-acetone (95:5); Three developments; detection: anisaldehyde- H_2SO_4 ; Rt (GC): 17.74 min.; EI-MS m/z (%): 154 $[\text{M}]^+$ (0,2), 136 (11), 121 (27), 107 (12), 93 (95), 80 (29), 71 (99), 69 (57), 67 (32), 55 (58), 43 (99), 41 (100); for ^1H and ^{13}C -NMR data see Table 3.

2.5. Antimicrobial activity

The antimicrobial activity of the essential oil and its fractions and isolated compounds was determined by the broth microdilution method (NCCLS, 1997; NCCLS, 2002). Initially, the test samples were solubilized in methanol in order to obtain stock solutions. The stock solutions were diluted (1:100) in the appropriate medium, Muller-Hinton broth for bacterial strains and buffered RPMI 1640 broth for yeasts. From these, serial dilutions were prepared in

96-well microtiter plates over the range of 100 to 6400 µg/mL for the essential oil and fractions, and 50 to 3200 µg/mL for isolated compounds. The microorganisms used in the test are listed in Table 2.

Bacterial strains and yeasts were grown in Muller-Hinton agar (24 h / 35°C) and Sabouraud dextrose agar (48 h / 35°C), respectively. Bacterial suspensions of 0.5 McFarland standard turbidity (1×10^8 CFU/mL) were prepared by dilution with saline and later diluted (1:100) with Muller-Hinton broth (1×10^6 CFU/mL). Aliquots of 10 µL (1×10^4 CFU/mL) of inoculum were added to each well of the microtiter plate, already containing 200 µL of the medium plus different concentrations of the test samples. In parallel, yeast suspensions were prepared by dilution with 0.85% NaCl solution and adjusted to 0.5 McFarland standard turbidity (1×10^6 to 5×10^6 CFU/mL). These suspensions were diluted with sterilized water (1:50) and buffered RPMI 1640 broth (1:20), resulting in 1.0×10^3 to 5.0×10^3 CFU/mL. 100 µL of the inoculum was added to each well of the microtiter plate already containing 100 µL of the essential oil solution. The microplates with bacterial strains were incubated for 24 h at 35°C. Those with yeasts were incubated for 48 h at 35°C. The same tests were performed simultaneously for inoculum growth and sterility control. The final concentration of methanol did not exceed 1% and did not affect the growth of the microorganisms. Itraconazole and ciprofloxacin were used as positive controls. The alga *Prototheca zopfii* was assayed in the same way as described for yeasts.

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined as the lowest concentration of essential oil that completely inhibited visible growth of microorganisms. To determine the minimum bactericidal and fungicidal concentrations (MBC/MFC), 10 µL broth was taken from each well without microbial growth and inoculated in Muller-Hinton and Sabouraud dextrose agar, respectively. The plates were incubated for 48 h at 35°C until they were read. The MBC and MFC were defined as the lowest concentration of the essential oil capable of

killing the inoculum.

3. Results and Discussion

The semi-quantitative and qualitative results of the analyses of the essential oil and its fractions are shown in Table 1. The data for antimicrobial activity are summarized in Table 2.

The essential oil showed a broad spectrum of antimicrobial activity. *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* were the most sensitive microorganisms (Table 2). *S. cerevisiae* has been regarded as non-pathogenic, but recent evidence indicates that some isolates are virulent and have been implicated in the induction of disease, particularly in immunocompromised individuals (Murphy and Kavanagh, 1999). Serious infections caused by *S. aureus* are a worldwide phenomenon, and occur in both hospital and community settings (Appelbaum, 2006). The increase in the prevalence of methicillin-resistant strains and strains with reduced susceptibility to vancomycin has been reported (Bax et al., 2000; Webster et al., 2007). Multidrug-resistant isolates also have hindered the treatment of infections caused by *K. pneumoniae* (DiPersio and Dowzicky, 2007). This microorganism was the only Gram-negative bacterium that was susceptible to the essential oil; both *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* were resistant (Table 2). In general, the low susceptibility of Gram-negative organisms has been attributed to their cell envelope. This structure, formed by a double membrane of phospholipids and lipopolysaccharides, has been shown to be an effective permeability barrier to many antimicrobial agents (Nikaido, 1989; Sikkema et al., 1995; Burt, 2004; Holey and Patel, 2005), including essential oils and their constituents (Griffin, 2000; Mann et al., 2000). Metabolic differences may also be involved in their resistance (Holey and Patel, 2005).

Several papers have reported the antimicrobial activity of the essential oil of *L. alba* (Souza et al., 2005; Duarte et al., 2005; Oliveira et al., 2006; Duarte et al., 2007; Vera et al.,

2007). Oliveira et al. (2006) attributed this activity to the high content of oxygenated monoterpenoids (51%), mainly represented by aldehydes and alcohols. The oxygenated compounds also comprised the majority of constituents identified in our study (Table 1). To determine which substances are responsible for the activity, a bio-guided fractionation of the essential oil was carried out.

All fractions of the essential oil showed activity against any of the microorganisms tested, except *P. aeruginosa* (Table 2). Fractions 2, 4 and 5 were the most active. Comparing the fractions with essential oil, the MIC values for some of the microorganisms tested decreased on the order of one to four dilutions. This inhibitory activity occurs in consequence of microbicidal effects, which is more pronounced in these fractions. The increase of the concentration of the potentially active constituents in these fractions (Table 1) could explain these results.

In fraction 2, antifungal activity was relatively more pronounced (Table 2). *S. cerevisiae* was the most sensitive microorganism, followed by the Gram-positive bacterium *S. aureus*. The major constituent of this fraction is 1,8-cineole (Table 1). The antimicrobial properties of this oxygenated monoterpene have been thoroughly studied by the broth microdilution method (Hammer et al., 2003; Sibanda et al., 2004; Mondello et al., 2006; Setzer et al., 2006; Zyl et al., 2006; Vagionas et al., 2007). Of the less-abundant constituents (Table 1), antimicrobial activity has been reported for α -pinene (Hammer et al., 2003; Ríos et al., 2003; Skaltsa et al., 2003; Alma et al., 2004; Setzer et al., 2006; Zyl et al., 2006; Melliou et al., 2007; Vagionas et al., 2007), camphene (Alma et al., 2004), sabinene (Angioni et al., 2003), camphor (Sibanda et al., 2004; Vagionas et al., 2007), (*E*)-cariophyllene (Skaltsa et al., 2003; Sibanda et al., 2004) and germacrene D (Setzer et al., 2006). The last two constituents, however, have been reported as inactive by other authors (Silva, 2006; Deuschle et al., 2007; Duarte et al., 2007; Vagionas et al., 2007).

In the case of fraction 4, the most sensitive microorganism was *S. aureus*, followed by *S. cerevisiae* (Table 2). Although yeast and fungi are considered more susceptible than bacteria (Holey and Patel, 2005), observing the data in Tables 1 and 2 we can infer that the microbial susceptibility also depended on the total composition of the tested sample. Linalool is the major compound of this fraction, followed by germacrene D-4-ol and τ -muurolol (Table 1). All these constituents have an alcoholic function, whose presence can be crucial for their antimicrobial activity (Sikkema et al., 1995; Dorman and Deans, 2000; Hammer et al., 2003; Burt, 2004; Holey and Patel, 2005). However, only linalool shows such properties described for the broth microdilution method (Hammer et al., 2003; Ríos et al., 2003; Skaltsa et al., 2003; Sibanda et al., 2004; Setzer et al., 2006; Zyl et al., 2006; Cox and Markham, 2007; Vagionas et al., 2007).

Lower values of MIC were observed for fraction 5 (Table 2). *S. cerevisiae* and *S. aureus* were the most susceptible microorganisms, with identical values of MIC. The inhibitory activity against *Candida glabrata* was also significant (Table 2). Fraction 5 was constituted basically by borneol, τ -muurulol and α -terpineol (Table 1). Of these, borneol (Alma et al., 2004; Sibanda et al., 2004; Vagionas et al., 2007) and α -terpineol (Cosentino et al., 1999; Hammer et al., 2003; Alma et al., 2004; Sibanda et al., 2004; Papadopoulos et al., 2006; Setzer et al., 2006; Cox and Markham, 2007) exhibit antimicrobial activity.

For fraction 1, the spectrum of action was restricted to *Candida* sp., *S. cerevisiae* and *Prototheca zopfii*. In comparison with the whole essential oil, there was no decrease in the MIC values (Table 2). This apparent reduction in biological activity may be due to the reduction of active constituents in the fraction, as well as to the loss of additive or synergistic effects among the constituents of the essential oil (Cos et al., 2006). Fraction 1 was constituted almost exclusively by hydrocarbon sesquiterpenoids (Table 1). With the exception of α -humulene (Setzer et al., 2006) and (*E*)-cariophyllene (Skaltsa et al., 2003; Sibanda et al.,

2004) mentioned previously, there are few reports in the literature on the antimicrobial activity of hydrocarbon sesquiterpenoids by the broth microdilution method. The hydrophobicity of essential oils, or more specifically their capacity to interfere with structures of the microbial cell membrane, are indicated as an important characteristic for their antimicrobial activity (Sikkema et al., 1995; Burt, 2004; Holey and Patel, 2005). Although the constituents of fraction 1 are less polar and therefore hydrophobic (Table 1), their presence did not result in an increase in antimicrobial activity (Tables 2). According to Griffin (2000), hydrocarbon compounds tend to be relatively inactive regardless of their structural type, and this inactivity appears to be closely related to their limited hydrogen-bond capacity and water solubility, and to a lesser extent to the octanol-water partition coefficient ($\log K_{ow}$). All of these factors are expected to affect the bioavailability of the terpenoids. However, water solubility seems to be the limiting factor in the expression of activity versus inactivity.

Similarly to fraction 1, there was no reduction of the MIC values in fraction 3. This fraction has camphor as its major compound, followed by germacrene D-4-ol (Table 1). The antimicrobial properties of camphor are known (Sibanda et al., 2004; Vagionas et al., 2007). Germacrene D-4-ol also has this property, as described below (Table 2). In this case, the observed reduction in antimicrobial activity could be due to the antagonistic interaction between some of the constituents present in this fraction (Table 1). The occurrence of antagonism has also been reported between terpenoid constituents (Faleiro et al., 2003).

The bio-guided fractionation of the essential oil led to the isolation of two compounds, germacrene D-4-ol (1) and linalool (2) (Figures 1 and 2). Their structures were determined using GC-MS, ^1H RMN, ^{13}C RMN, DEPT-135, H-H COSY and H-C HETCOR. Compound 2 was identified as linalool by comparing its spectral data (Table 3) with the literature (Konda et al., 1997).

Although compound 1, identified as germacrene-D-4-ol, is a known substance occurring in several essential oils, the literature does not describe its NMR spectroscopic data, which are discussed as follows. Compound 1 was isolated as a colorless oil. The suspected molecular ion peak at m/z 222 (EI-MS) corresponds to the molecular formula $C_{15}H_{26}O$. This formula was supported by ^{13}C NMR and DEPT spectra, which showed 15 carbon signals due to 4 CH_3 -, 4 CH_2 -, 5 CH -groups and 2 quaternary C-atoms. The signal in δ_C 73.08 was assigned to C1, attached to an OH-group. The fragment ion at m/z 204 [$M - 18$] corresponds to the loss of H_2O and confirmed the presence of an OH-group. Four chemical shifts between δ_C 125.71 and 140.04 indicate the presence of two double bonds.

The 1H NMR spectrum showed signals for 3 olefinic protons at δ_H 5.25 (H-2), 5.18 (H-3) and 4.95 (H-8). The coupling constant of 15.72 Hz indicates *E*-configuration between H-2 and H-3. The substitution pattern of the ring was confirmed by the signals of the isopropyl group at δ_H 1.42 (H-12), 0.83 (CH_3 -13) and 0.79 (CH_3 -14), as well as 2 singlets at δ_H 1.19 and 1.54, assigned CH_3 -11 and 15. Additionally, the proton of the OH-group can be observed at δ_H 1.26 (s). The signals at δ_H 2.51 (dddd) and 1.65 (dt) were assigned to H-9 β and H-10 β protons (Table 3).

Germacrene D-4-ol (1) showed antimicrobial activity against *S. cerevisiae*, *P. zopfii* and *S. aureus*, whereas linalool (2) was inactive against all microorganisms tested at concentrations up to 3200 $\mu g/mL$ (Table 2). It is interesting to note that germacrene D, a precursor in the germacrene D-4-ol biosynthesis, has been reported as inactive at concentrations up to 5000 $\mu g/mL$ (Deuschle, 2003; Deuschle et al., 2007). Nevertheless germacrene D-1-hydroperoxide, obtained by photo-oxidation of germacrene D, showed antimicrobial activity against *S. cerevisiae* (MIC = 2.5 mg/mL). Additionally, this hydroperoxide partially inhibits the growth of *P. zopfii* (80%) at 5 mg/mL (Francescato,

2007). In comparison, the antimicrobial potency of germacrene D-4-ol is higher (Table 2), and this feature is probably related to the presence of the hydroxyl group.

The bio-guided fractionation of the essential oil of *L. alba* showed that the fractions containing greater amounts of oxygenated substances are more active than those containing hydrocarbon compounds as major constituents. On the other hand, this is not the only property responsible for the antimicrobial activity, because the linalool was inactive. The isolation of germacrene D-4-ol as one of the active compounds of the essential oil of *L. alba* provided a new scientific basis for the quality control of phytomedicines prepared from it, because this sesquiterpenoid could be used as a chemical and biological marker.

Acknowledgements

To the Brazilian Pharmacopeia for literature support, to Dr. Gilberto Dolejal Zanetti for the identification of the species, and to CAPES and CNPq for financial support.

References

- Adams, R.P., 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadupole mass spectroscopy. Carol Stream, Allured Publishing Corporation.
- Alma, M.H., Nitz, S., Kollmannsberger, H., Digrak, M., Efe, F.T., Yilmaz, N., 2004. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the gum of Turkish pistachio (*Pistacia vera* L.). Journal of Agriculture and Food Chemistry 52, 3911-3914.
- Angioni, A., Barra, A., Russo, M.T., Coroneo, V., Dessiã, S., Cabras, P., 2003. Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 3073-3078.

- Appelbaum, P.C., 2006. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 12, 16–23.
- Barros, F.M.C., Pereira, K.N., Zanetti, G.D., Heinzmann, B.M., 2007. Plantas de uso medicinal no município de São Luiz Gonzaga, RS, Brasil. *Latin American Journal of Pharmacy* 26, 652-662.
- Bax, R., Mullan, N., Verhoef, J., 2000. The millennium bugs – the need for and development of new antibacterials. *International Journal of Antimicrobial Agents* 16, 51-59.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223-253.
- Cos, P., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V., Maes, L., 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept’. *Journal of Ethnopharmacology* 106, 290–302.
- Cosentino S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., Palmas, F., 1999. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 29, 130–135.
- Cox, S.D., Markham, J.L., 2007. Susceptibility and intrinsic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to selected plant volatile compounds. *Journal of Applied Microbiology* 103, 930–936.
- Deuschle, R.A.N., 2003. Atividade antimicrobiana e análise fitoquímica de *Senecio desiderabilis* Vellozo (Asteraceae). MSc. Thesis, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.
- Deuschle, R.A.N., Camargo, T., Alves, S.H., Mallmann, C.A., Heinzmann, B.M., 2007. Fracionamento do extrato diclorometânico de *Senecio desiderabilis* Vellozo e avaliação da atividade antimicrobiana. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17, 71-75.
- Di Stasi, L.C., Oliveira, G.P., Carvalhaes, M.A., Queiroz-Junior, M., Tien, O.S., Kakinami,

- S.H., Reis, M.S., 2002. Fitoterapia 73, 69-91.
- DiPersio, J.R., Dowzicky, M.J., 2007. Regional variations in multidrug resistance among Enterobacteriaceae in the USA and comparative activity of tigecycline, a new glycylicline antimicrobial. International Journal of Antimicrobial Agents 29, 518–527.
- Dorman, H.J.D., Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology 88, 308–316.
- Duarte, M.C.T., Figueira, G.M., Sartoratto, A., Rehder, V.L.G., Delarmelina, C., 2005. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 97, 305-311.
- Duarte, M.C.T., Leme, E.E., Delarmelina, C., Soares, A.A., Figueira, G.M., Sartoratto, A., 2007. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. Journal of Ethnopharmacology 111, 197-201.
- Faleiro, M.L., Miguel, M.G., Ladeiro, F., Venâncio, F., Tavares, R., Brito, J.C., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., 2003. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. Letters in Applied Microbiology 36, 35–40.
- Farmacopéia Brasileira, 2000. 4th ed. São Paulo: Atheneu.
- Francescato, L.N., 2007. Constituintes de *Senecio heterotrichius* DC.: Isolamento, elucidação estrutural, derivatização e avaliação da atividade antimicrobiana; Estudo dos constituintes voláteis de outras espécies de *Senecio*. MSc Thesis, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.
- Griffin, S., 2000. Aspects of antimicrobial activity of terpenoids and the relationship to their molecular structure. Faculty of Science, Technology and Agriculture, University of Western Sydney, Hawkesbury, Richmond, NSW, Australia.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., 2003. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. Journal of Applied Microbiology 95, 853-860.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Joseph, H., Bailleul, F., 2008. Ethnopharmacology of *Lippia alba*.

- Journal of Ethnopharmacology 116, 211-222.
- Holley, R.A., Patel, D., 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* 22, 273-292.
- Konda, Y., Toida, T., Kaji, E., Takeda, K., Harigaya, Y., 1997. First total synthesis of two new diglycosides, neohancosides A and B, from *Cynanchum hancockianum*. *Carbohydrate Research* 301, 123-143.
- Mann, C.M., Cox, S.D., Markham, J.L., 2000. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Letters in Applied Microbiology* 30, 294-297.
- Melliou, E., Stratis, E., Chinou, I., 2007. Volatile constituents of propolis from various regions of Greece – Antimicrobial activity. *Food Chemistry* 103, 375–380.
- Mondello, F., Bernardis, F.D., Girolamo, A., Cassone, A., Salvatore, G., 2006. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. *BMC Infectious Diseases* 6, 158, DOI: 10.1186/1471-2334-6-158.
- Murphy, A., Kavanagh, K., 1999. Emergence of *Saccharomyces cerevisiae* as a human pathogen - Implications for biotechnology. *Enzyme and Microbial Technology* 25, 551-557.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard, 2nd ed. M27-A2. Wayne, PA, USA.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard, M7-A4, Wayne, PA, USA.
- Neely, A.N., Holder, I.A., 1999. Antimicrobial resistance. *Burns* 25, 17-24.

Nikaido, H., 1989. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33, 1831-1836.

Oliveira, D.R., Leitão, G.G., Santos, S.S., Bizzo, H.R., Lopes, D., Alviano, C.S., Alviano, D.S., Leitão, S.G., 2006. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 108, 103-108.

Papadopoulos, C.J., Carson, C.F., Hammer, K.A., Riley, T.V., 2006. Susceptibility of pseudomonads to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and components. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58, 449-451.

Pascual, M.E., Slowing, K., Carretero, M.E., Mata, D.S., Villar, A., 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology* 76, 201-214.

Ríos, M.Y., Castrejón, F., Robledo, N., León, I., Rojas, G., Navarro, V., 2003. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Annona cherimola* (Annonaceae). *Journal of the Mexican Chemical Society* 47, 139-142.

Setzer, W.N., Schmidt, J.M., Noletto, J.A., Vogler, B., 2006. Leaf oil compositions and bioactivities of Abaco bush medicines. *Pharmacologyonline* 3, 794-802.

Sibanda, S., Chigwada, G., Poole, M., Gwebu, E.T., Noletto, J.A., Schmidt, J.M., Rea, A.I., Setzer, W.N., 2004. Composition and bioactivity of the leaf essential oil of *Heteropyxis dehniae* from Zimbabwe. *Journal of Ethnopharmacology* 92, 107-111.

Sikkema, J., Bont, J.A.M., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59, 201-222.

Silva, C.M., 2006. Sesquiterpenóides de *Senecio bonariensis* Hook. et Arn. MSc Thesis, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

Skaltsa, H.D., Demetzos, C., Lazari, D., Sokovic, M., 2003. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. *Phytochemistry* 64, 743-752.

- Souza, E.L., Lima, E.O., Freire, K.R.L., Sousa, C.P., 2005. Inhibitory action of some essential oil and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48, 245-250.
- Vagionas, K., Graikou, K., Ngassapa, O., Runyoro, D., Chinou I., 2007. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of three *Satureja* species growing in Tanzania. *Food Chemistry* 103, 319–324.
- Vera, J.R., Pastrana, P.F., Fernández, K., Viña, A., 2007. Actividad antimicrobiana *in vitro* de volátiles de *Lippia alba* y extractos orgânicos y acuoso de *Lusticia pectoralis* cultivadas em diferentes pisos térmicos del departamento del Tolima. *Scientia et Technica* 13, 345-348.
- Webster, D., Rennie, R.P., Brosnikoff, C.L., Chui, L., Brown, C., 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Canada. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 57, 177–181.
- Zyl, R.L., Seatlholo, S.T., Vuuren, S.F., 2006. The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. *Journal of Essential Oil Research* 18, 129-133.

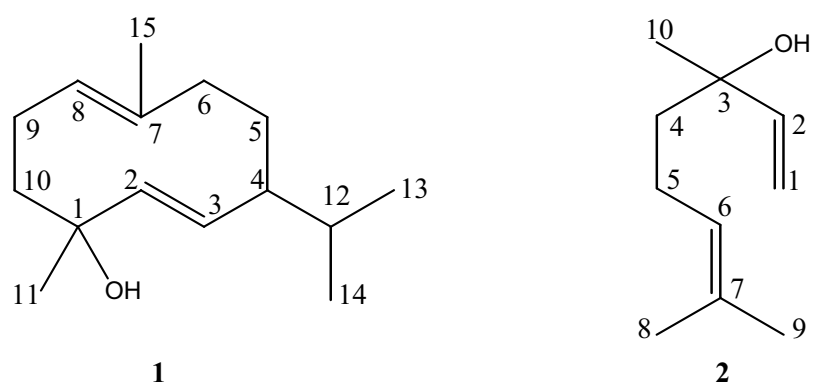


Fig. 1. Structures of compounds 1 and 2.

Table 1: Chemical constituents of the essential oil and its fractions from *Lippia alba* (Mill.)

N. E. Brown (Verbenaceae).

Table 2: Antimicrobial activity of the essential oil and its fractions and isolated substances

from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae).

Table 3: ^1H (400 MHz, CDCl_3) and ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) NMR data for compounds 1 and

2.

Table 1: Chemical constituents of the essential oil and fractions of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae).

Formula	Essential oil			Fraction 1			Fraction 2			Fraction 3			Fraction 4			Fraction 5				
	Yield (% w/w)	Rt	RI cal	%	Rt	RI cal	%	Rt	RI cal	%	Rt	RI cal	%	Rt	RI cal	%	Rt	RI cal	%	
																				0.60
C ₁₀ H ₁₆		10.73	930	0.61	-	-	0.19	10.83	933	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	939
C ₁₀ H ₁₆		11.40	947	1.42	-	-	1.25	11.38	946	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	954
C ₁₀ H ₁₆		12.40	971	4.37	-	-	3.62	12.46	973	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	975
C ₁₀ H ₁₆		12.54	975	0.40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	979
C ₁₀ H ₁₆		13.16	990	2.11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	991
C ₁₀ H ₁₆		14.71	1028	2.88	14.88	1027	0.60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1029
C ₁₀ H ₁₈ O		14.84	1032	22.98	-	-	67.98	14.73	1029	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1031
C ₁₀ H ₁₈ O	(Z)-Sabinene hydrate	16.49	1073	0.21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.74	16.32	1069	1070	-	-	1070
C ₁₀ H ₁₆	Isoterprenolene	16.96	1085	0.33	17.25	1087	0.42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1088
C ₁₀ H ₁₈ O	Linalool	17.69	1103	6.89	-	-	-	-	-	-	-	-	57.31	17.64	1102	1101	1097	-	-	1097
C ₁₀ H ₁₆ O	Camphor	19.40	1148	22.62	-	-	4.25	19.13	1141	62.40	19.36	1143	0.68	19.16	1142	1146	1146	-	-	1146
C ₁₀ H ₁₄ O	Pinocarvone	19.97	1164	1.33	-	-	0.46	20.05	1166	2.78	20.07	1163	-	-	-	-	-	-	-	1165
C ₁₀ H ₁₈ O	Borneol	20.38	1174	2.45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	48.17	20.03	1165	1169	1169
C ₁₀ H ₁₈ O	α -Terpineol	21.31	1199	0.53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.64	21.07	1193	1189	1189
C ₁₀ H ₁₄ O	Myrtenal	-	-	-	-	-	-	-	-	0.96	21.32	1196	-	-	-	-	-	-	-	1196
C ₁₀ H ₁₄ O	Verbenone	21.74	1211	0.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.64	21.68	1210	1205	1205
C ₁₂ H ₂₀ O	Isobornil acetate	24.34	1285	0.30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1286
C ₁₅ H ₂₄	α -Copaene	27.35	1374	0.46	27.49	1377	3.53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1377
C ₁₅ H ₂₄	β -Elemene	-	-	-	28.02	1393	1.79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1391
C ₁₅ H ₂₄	α -Gurjunene	-	-	-	28.59	1411	0.80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1410
C ₁₅ H ₂₄	(E)-Cariophyllene	28.78	1418	2.86	28.91	1421	19.01	28.62	1413	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1419

Table 2: Antimicrobial activity of the essential oil, fractions and isolated substances of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae).

Microorganisms	Essential oil		Fraction 1		Fraction 2		Fraction 3		Fraction 4		Fraction 5		1		2		Ciprof Itrac	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25293	1600	-	> 6400	-	800	800	3200	6400	100	100	100	100	800	800	> 3200	> 3200	1.00	NT
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	> 6400	-	> 6400	-	6400	> 6400	> 6400	-	1600	1600	1600	1600	NT	NT	> 3200	> 3200	1.00	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	> 6400	-	> 6400	-	> 6400	-	> 6400	-	> 6400	-	> 6400	-	NT	NT	NT	NT	2.00	NT
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	> 1600	-	> 6400	-	6400	> 6400	> 6400	-	3200	3200	3200	3200	NT	NT	NT	NT	0.50	NT
<i>Candida albicans</i> ATCC 4473	3200	3200	> 3200	-	1600	1600	> 3200	-	3200	3200	1600	1600	NT	NT	NT	NT	NT	0.06
<i>Candida glabrata</i> Ci	3200	3200	> 3200	-	1600	1600	> 3200	-	3200	3200	800	800	NT	NT	NT	NT	NT	0.25
<i>Prototheca zopfii</i> Ci	> 3200	-	> 3200	-	1600	1600	> 3200	-	1600	1600	1600	1600	400	400	> 3200	> 3200	NT	4.00
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 28952	800	800	800	800	100	100	3200	3200	800	800	100	100	200	200	> 3200	> 3200	NT	0.06

MIC: minimum inhibitory concentration (µg/mL); MBC: minimum bactericidal concentration (µg/mL); MFC: minimum fungicidal concentration

(µg/mL); ATCC: American Type Culture Collection; Ci: Clinical isolate; 1: Germacrene D-4-ol; 2: Linalool; Ciprof: Ciprofloxacin; Itrac:

Itraconazole; -: No activity; NT: Not tested

Table 3: ^1H (400 MHz, CDCl_3) and ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) NMR data of compound 1 and 2.

Germacrene D-4-ol (1)						Linalol (2)					
Carbon	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult., J in Hz) ^a	COSY	Carbon	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult., J in Hz) ^a	COSY	Carbon	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult., J in Hz) ^a	COSY
1	73.08	-	-	1	111.6	5.24 (dd, 1.12, 17.32, H-1a)	-	1	111.6	5.24 (dd, 1.12, 17.32, H-1a)	1b, 2
2	140.04	5.25 (d, 15.72)	3	2	145.0	5.09 (dd, 1.10, 10.78, H-1b)	3	2	145.0	5.94 (dd, 10.8, 17.34)	1a, 2
3	125.71	5.18 (dd, 9.20, 15.72)	2, 4	3	73.4	-	2, 4	3	73.4	-	1a, 1b
4	52.80	2.03 (m)	3, 5	4	42.0	1.59 (m)	3, 5	4	42.0	1.59 (m)	-
5	25.93	1.31 (m)	4, 6	5	22.7	2.04 (m)	4, 6	5	22.7	2.04 (m)	4, 5
6	41.24	2.24 (m)	5	6	124.3	5.15 (d, 7.0)	5	6	124.3	5.15 (d, 7.0)	4, 6
7	132.54	-	-	7	131.8	-	-	7	131.8	-	5, 8, 9
8	128.85	4.95 (dd, 11.20)	9 α , 9 β , 15	8	17.6	1.63 (s)	9 α , 9 β , 15	8	17.6	1.63 (s)	-
9	23.65	1.94 (m, H-9 α)	8, 9 β	9	25.6	1.71 (s)	8, 9 β	9	25.6	1.71 (s)	6
		2.51 (dddd, 3.60, 12.62, 14.42, 16.22, H-9 β)	8, 9 α , 10 α , 10 β	10	27.8	1.31 (s)	8, 9 α , 10 α , 10 β	10	27.8	1.31 (s)	6
10	39.59	1.52 (m, H-10 α)	9 α , 9 β , 10 β				9 α , 9 β , 10 β				-
		1.65 (dt, 3.7, 14.08, H-10 β)	9 α , 9 β , 10 β				9 α , 9 β , 10 β				-
11	30.67	1.19 (s)	-	11	30.67	1.19 (s)	-	11	30.67	1.19 (s)	-
12	32.97	1.42 (m)	13, 14	12	32.97	1.42 (m)	13, 14	12	32.97	1.42 (m)	-
13	20.57	0.83 (d, 6.70)	12	13	20.57	0.83 (d, 6.70)	12	13	20.57	0.83 (d, 6.70)	-
14	18.94	0.79 (d, 6.80)	12	14	18.94	0.79 (d, 6.80)	12	14	18.94	0.79 (d, 6.80)	-
15	16.68	1.54 (s)	8	15	16.68	1.54 (s)	8	15	16.68	1.54 (s)	-

δ : values are expressed in ppm; a: ^1H NMR shifts determined from 1D and HETECOR spectra.

4 RESULTADOS ADICIONAIS

4.1 Análise da fragmentação do germacreno D 4-ol por EM-IE

O composto 1 apresentou uma massa molecular de 222 u.m.a. evidenciada pela presença do sinal correspondente no espectro de massas por impacto eletrônico (EM-IE) com energia do feixe de elétrons em 70 eV (Figura 14). A baixa intensidade deste pico deve-se ao fato de que os íons moleculares de constituintes hidroxilados são bastante instáveis, sendo, por isso, rapidamente fragmentados (SILVERSTEIN, WEBSTER, 2000).

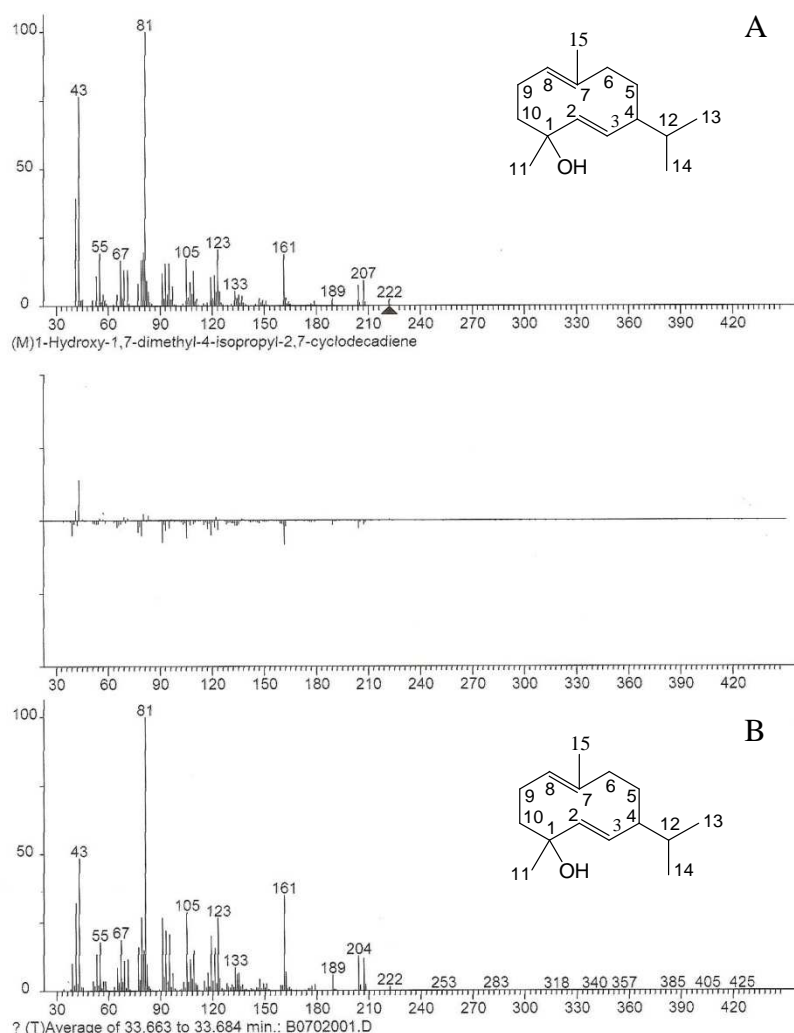


Figura 14 – Espectro de massas por impacto eletrônico do germacreno D 4-ol (A, NIST 98) e do composto 1 (B).

A Figura 15 apresenta uma proposta de fragmentação para o composto 1, a qual será

descrita em seguida.

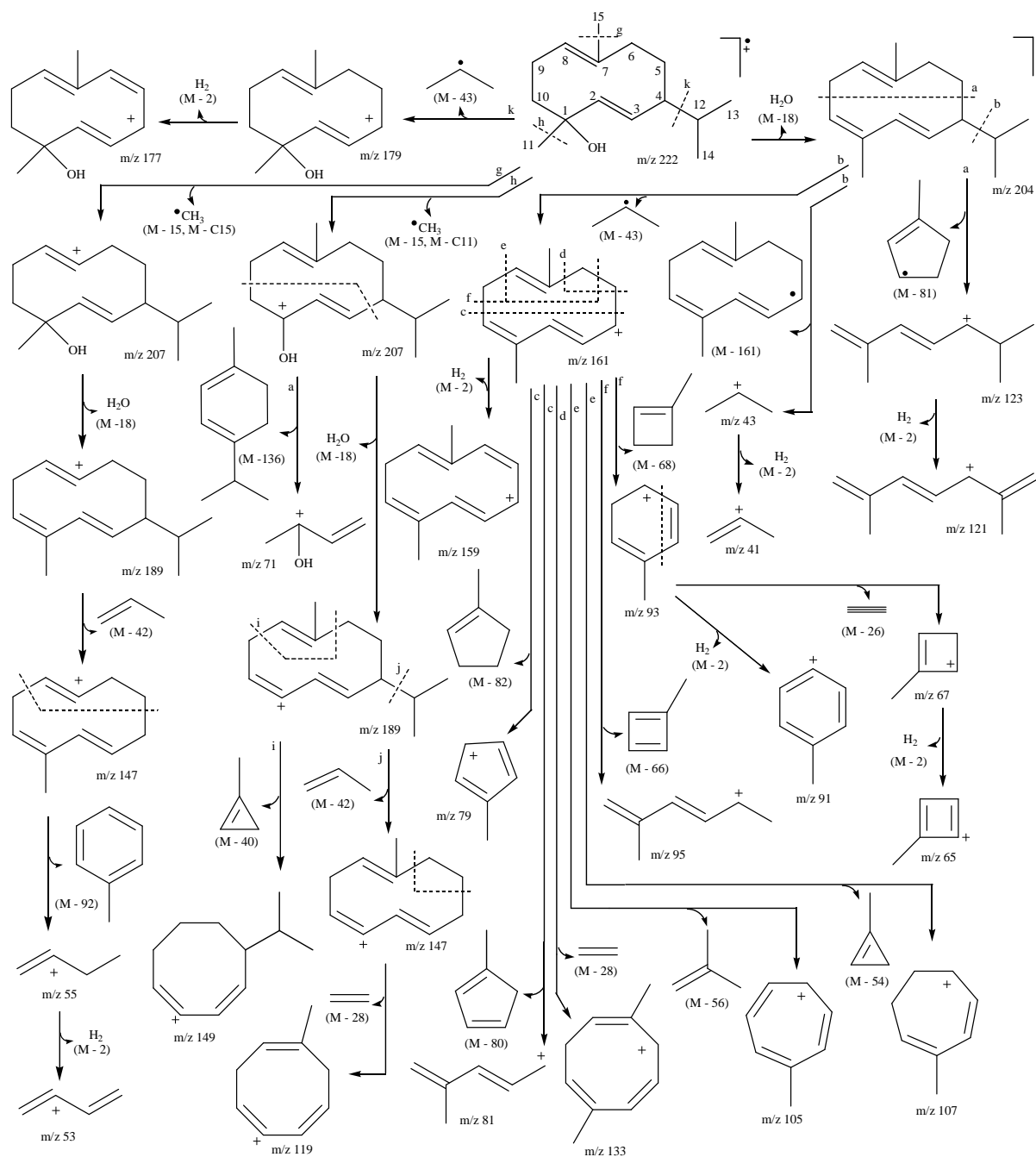


Figura 15 - Proposta de fragmentação do germacreno D 4-ol por EM-IE em 70 eV.

A partir do íon molecular $[M^+]$ com m/z 222 u.m.a., a eliminação de uma molécula de água origina o fragmento com m/z 204 u.m.a. Este, por sua vez, forma o carbocátion com m/z 123 u.m.a. por meio do rompimento de duas ligações, entre os carbonos 4 e 5, e, 9 e 10, com a eliminação de um radical de 81 u.m.a (Figura 15, rota a). Quando o rompimento da ligação ocorre entre os carbonos 4 e 12, entretanto, duas situações podem ocorrer. Na primeira, a eliminação do radical isopropila resulta no íon com m/z 161 u.m.a. Na segunda, a eliminação

do fragmento mais pesado (161 u.m.a.) na forma de radical origina o carbocátion com m/z 43 u.m.a (rotas b). Na seqüência de fragmentação dos carbocátions com m/z 43, 123 e 161 u.m.a., originam-se os fragmentos com m/z 41, 121 e 159 u.m.a. através da eliminação uma molécula de hidrogênio, respectivamente.

O carbocátion com m/z 161 u.m.a. pode originar pelo menos outros sete fragmentos. A quebra das ligações entre os carbonos 4 e 5, e, 9 e 10, com a eliminação de uma molécula neutra de 80 ou 82 u.m.a., resultam nos fragmentos com m/z 81 (pico base) ou 79 u.m.a (rotas c). O rompimento das ligações entre os carbonos 4 e 5, e, 6 e 7, por sua vez, seguido da eliminação de molécula neutra de etileno (28 u.m.a.) dá origem ao carbocátion com m/z 133 u.m.a (rota d). Já os carbocátions com m/z 105 e 107 u.m.a. resultam do rompimento das ligações entre carbonos 5 e 6, e, 8 e 9, seguidos da eliminação de uma molécula neutra de 56 ou 54 u.m.a., respectivamente (rotas e). Por fim, o rompimento de outras duas ligações, entre os carbonos 5 e 6, e, 9 e 10, com a eliminação de um fragmento de 66 ou 68 u.m.a. na forma de molécula neutra, explicam os carbocátions com m/z 95 e 93 u.m.a (rotas f). A partir do fragmento com m/z 93 u.m.a., a saída de uma molécula de hidrogênio forma o carbocátion com m/z 91 u.m.a, ao passo que a eliminação de uma molécula neutra de acetileno (26 u.m.a.) resulta no fragmento com m/z 67 u.m.a. Através da eliminação de hidrogênio molecular, este último fragmento pode formar ainda o carbocátion com m/z 65 u.m.a.

O fragmento com m/z 207 u.m.a. resulta da eliminação da metila 15 ou 11 na forma de radical a partir do íon molecular $[M^+]$ (m/z 222 u.m.a.). No primeiro caso (rota g), as subseqüentes eliminações de moléculas neutras (18, 42, 92 e 2 u.m.a.) resultam nos carbocátions com m/z 189, 147, 55 e 53 u.m.a. No segundo caso (rota h), o rompimento de duas ligações, entre os carbonos 3 e 4, e, 9 e 10, seguido da eliminação de um fragmento de 136 u.m.a. na forma de molécula neutra, explica a formação do carbocátion com m/z 71. Alternativamente, quando ocorre a eliminação de uma molécula de água, um novo fragmento com m/z 189 u.m.a. é formado. A partir dele, novas fragmentações com eliminação de moléculas neutras (40, 42 e 28 u.m.a.) (rotas i e j) resultam nos carbocátions com m/z 149, 147 e 119 u.m.a.

A partir do íon molecular $[M^+]$ com m/z 222 u.m.a. pode ocorrer também a eliminação de um radical isopropila (43 u.m.a.) (rota k) para formar um cátion com m/z 179 u.m.a. que, pela perda de uma molécula de hidrogênio, origina o pico em 177 u.m.a.

Com base no modelo de fragmentação apresentado pela substância, foi sugerido pelo banco de dados do equipamento uma série de substâncias com padrões de fragmentação semelhantes aos da amostra. Dentre as substâncias sugeridas, o germacreno D-4-ol foi o que

apresentou o modelo de fragmentação mais parecido ao composto 1 conforme indica o espectro apresentado na Figura 14. Este também está de acordo com os dados descritos na literatura para o germacreno D-4-ol (ADAMS, 2001).

4.2 Análise da fragmentação do linalol por EM-IE

O composto 2 apresentou uma massa molecular de 154 u.m.a. evidenciada pelo pico correspondente no espectro de massas por impacto eletrônico (EM-IE) com energia do feixe de elétrons em 70 eV (Figura 16). A difícil observação deste sinal, de modo análogo ao que ocorre no espectro de massas do germacreno D-4-ol (Figura 14), pode ser explicada pela presença do grupamento hidroxila na molécula (SILVERSTEIN, WEBSTER, 2000).

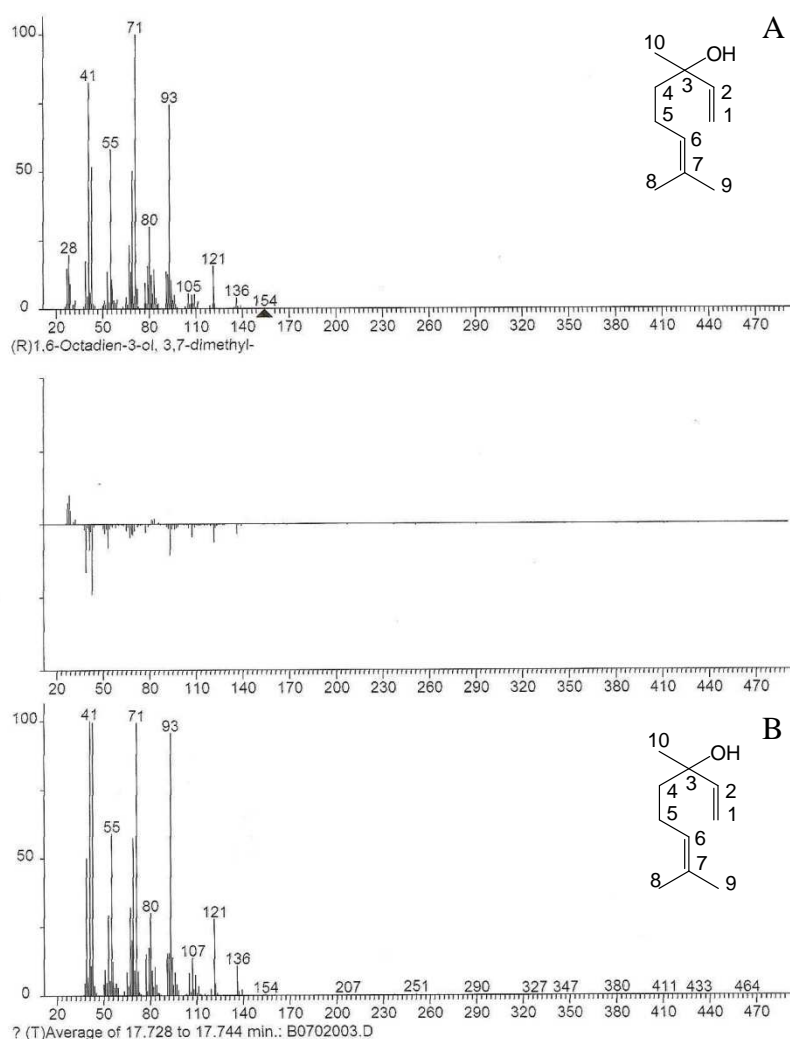


Figura 16 – Espectro de massas por impacto eletrônico do linalol (A, NIST 98) e do composto 2 (B).

A Figura 17 apresenta uma proposta de fragmentação para o composto 2, a qual será descrita em seguida.

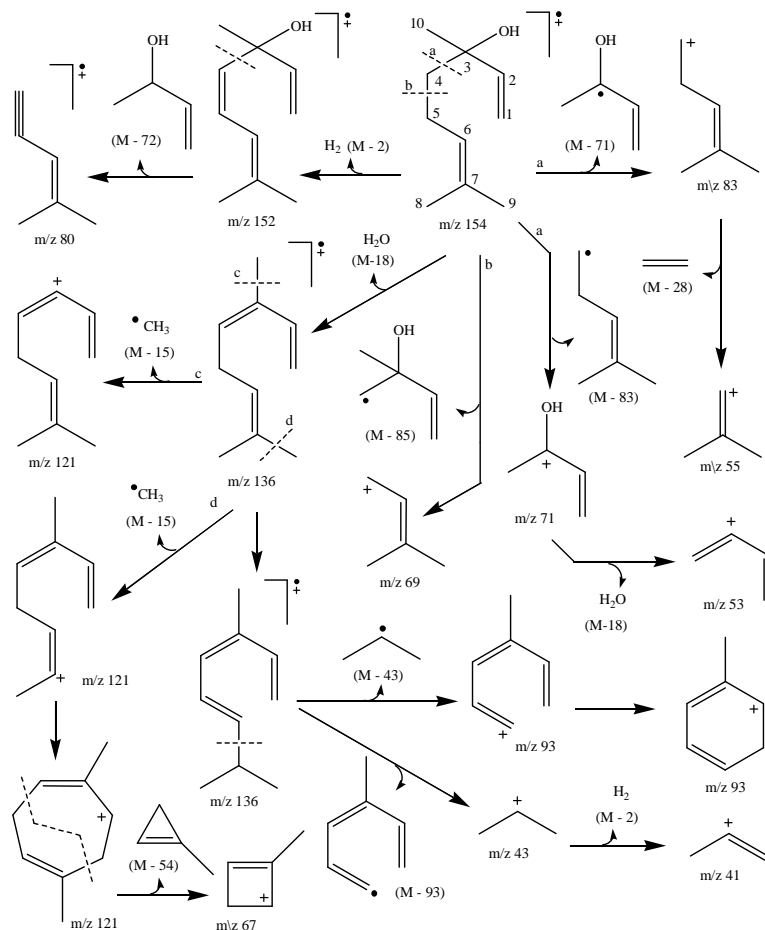


Figura 17 – Proposta de fragmentação do linalol por EM-IE em 70 eV.

A partir do íon molecular $[M^+]$ com m/z 154 u.m.a., a fragmentação β em relação ao grupo OH, entre os carbonos 3 e 4, com a eliminação de um radical (83 ou 71 u.m.a.) (rotas a) formam os fragmentos em m/z 71 (carbocátion terciário) e 83 u.m.a. (carbocátion primário). Quando ocorre fragmentação alílica, entre os carbonos 4 e 5 (rota b), entretanto, o fragmento preferencialmente formado é o de m/z 69 u.m.a. com a eliminação de um radical de 85 u.m.a. No primeiro caso, o carbocátion formado com m/z 83 u.m.a. dá origem ao fragmento com m/z 55 u.m.a. através da eliminação de uma molécula de etileno. Já o fragmento com m/z 71 u.m.a., através da eliminação de uma molécula de água, origina o fragmento com m/z 53 u.m.a.

A eliminação de uma molécula de água ou de hidrogênio a partir do íon molecular forma, ainda, os fragmentos em m/z 136 e 152 u.m.a. A partir deste último, a eliminação de

uma molécula neutra de 72 u.m.a. explica o fragmento em m/z 80 u.m.a.

O rompimento da ligação entre os carbonos 3 e 10 do fragmento com m/z 136 u.m.a. com a eliminação de um radical metila (15 u.m.a.) (rota c) origina o íon com m/z 121 u.m.a., o qual também pode ser formado pelo rompimento da ligação entre os carbonos 7 e 8 ou 7 e 9 (rota d). Nesta via, o rearranjo do íon em m/z 121 u.m.a. e o rompimento de duas ligações para a eliminação de uma molécula neutra de 54 u.m.a. resultam no fragmento com m/z 67 u.m.a.

A isomerização do fragmento com m/z 136 u.m.a. e a eliminação de um radical isopropila (43 u.m.a.) formam o íon em m/z 93 u.m.a. Quando ocorre a eliminação do fragmento mais pesado na forma de radical, entretanto, o íon formado é o de m/z 43 u.m.a., o qual, pela eliminação de uma molécula de hidrogênio, explica o pico em m/z 41 u.m.a.

Com base no modelo de fragmentação apresentado pelo composto, foi sugerido pelo banco de dados do equipamento uma série de substâncias com padrões de fragmentação semelhantes aos da amostra. Dentre as substâncias sugeridas, o linalol foi o que apresentou o modelo de fragmentação mais parecido ao composto 2 conforme indica a Figura 16. Este espectro de massas também está de acordo com os dados descritos na literatura para o linalol (ADAMS, 2001; LUAN, WÜST, 2002).

5 DISCUSSÃO GERAL

A possibilidade da descoberta de novos compostos com utilidade terapêutica e o desenvolvimento de modelos nacionais de saúde são alguns dos fatores que motivam o estudo das plantas. Os compostos encontrados na natureza revelam uma gama quase inacreditável de diversidade em termos de estruturas, propriedades físicas e biológicas (WALL, WANI, 1996). Esta ampla diversidade molecular faz das plantas uma das principais fontes de compostos bioativos, sendo, inclusive, superior àquela derivada dos processos de síntese (GUERRA, NODARI, 2003). Países detentores de uma rica biodiversidade e de conhecimentos tradicionais como o Brasil apresentam, portanto, enormes oportunidades de diminuir a sua dependência externa no setor farmacêutico pela criação de modelos nacionais de saúde, pautados em suas aptidões e carências (FUNARI, FERRO, 2005).

É nesse contexto que pode ser mensurada a importância do estudo de *Lippia alba*: uma planta medicinal nativa, amplamente utilizada pela medicina popular e com uma série de atividades farmacológicas comprovadas em estudos pré-clínicos.

Entre os diferentes metabólitos secundários descritos para *L. alba*, os óleos essenciais destacam-se por sua relativa abundância na espécie. Os métodos empregados para a extração dos óleos essenciais variam conforme a localização do óleo na planta, bem como a proposta de utilização do mesmo (SIMÕES, SPITZER, 2003). No caso de *L. alba*, o método comumente utilizado é a hidrodestilação em aparelho do tipo clewenger (ALEA et al., 1996; SINGH et al., 1999; ATTI-SERAFINI et al., 2002; CASTRO, MING, MARQUES, 2002; STASHENKO, JARAMILLO, MARTÍNEZ, 2004; TAVARES et al., 2004; BRAGA et al., 2005; DUARTE et al., 2005; BARBOSA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006; SILVA et al., 2006). Adicionalmente, o uso desta técnica justifica-se por ser um método preconizado pela Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000).

A completa caracterização dos metabólitos voláteis de uma planta, entretanto, requer o emprego de vários métodos de extração. Nesse sentido, já foram utilizados para a extração dos metabólitos voláteis de *L. alba* a hidrodestilação por microondas, a destilação simultânea à extração por solvente e a extração por fluido supercrítico (CO₂). De acordo com este estudo, os extratos obtidos por fluido supercrítico apresentam quantidades superiores de sesquiterpenóides e hidrocarbonetos de cadeias longas (Cn > 25). Já a destilação simultânea à extração por solvente resulta em um extrato com quantidade superior de monoterpenóides hidrocarbonados. Embora a hidrodestilação por microondas não cause mudanças

consideráveis na composição dos óleos essenciais, segundo a literatura consultada, duas de suas vantagens seriam a rapidez do processo e a reprodutibilidade, em comparação com a hidrodestilação convencional (STASHENKO, JARAMILLO, MARTÍNEZ, 2004). A disponibilidade do equipamento, entretanto, é um fator limitante para a utilização dessa técnica como ferramenta de rotina.

Variações qualitativas e semi-quantitativas na composição dos óleos essenciais de *L. alba* também puderam ser observadas entre os diferentes anos de análise (Manuscritos 1 e 2). Quantitativamente, o óleo essencial desta planta pode ser classificado em um período de alto (janeiro – verão / abril – outono / outubro – primavera) e outro de baixo rendimento (julho – inverno). Esta tendência também é observada em outras regiões do Brasil onde *L. alba* é cultivada (ATTI-SERAFINI et al., 2002; EHLERT, 2003; TAVARES et al., 2004; SILVA et al., 2006). Esta classificação é coerente para plantas de clima tropical conforme pode ser observado nas palavras de Marchese e Figueira (2005):

A variação da intensidade luminosa (irradiância) e temperatura durante o ano são função da sazonalidade e latitude dos locais de cultivo. Em geral, para plantas de clima tropical que são termoperiódicas e heliófitas (plantas de sol), as estações mais quentes e de maior radiação coincidem com a fenofase de maior produção de biomassa. A mesma lógica vale para a produção de óleos essenciais, onde geralmente a maior produção está associada a maior radiação e a maior taxa fotossintética das plantas (MARCHESE, FIGUEIRA, 2005).

No verão, foram observadas as maiores variações para os teores de óleo essencial (Manuscritos 1 e 2). Coincidentemente, esta é a estação em que freqüentemente ocorrem períodos de seca. Nesse caso, uma deficiência hídrica moderada pode servir de estímulo aos altos índices de óleo essencial observados nesta época (MARCHESE, FIGUEIRA, 2005; GOBBO-NETO, LOPES, 2007). Ao contrário, um excesso de chuva pode resultar na diminuição dos teores do óleo essencial de uma planta (GOBBO-NETO, LOPES, 2007), especialmente se ela armazenar o óleo em estruturas na superfície externa de suas folhas como é caso de *L. alba* (CORRÊA, 1992; SANTOS, INNECCO, SOARES, 2004).

Apesar da variabilidade, qualitativamente alguns aspectos chamam a atenção na comparação dos óleos essenciais obtidos em 2005 (Manuscrito 1) e 2006 (Manuscrito 2). Em concordância com os dados da literatura (MATOS et al., 1996; ATTI-SERAFINI et al., 2002; TAVARES et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006; SILVA et al., 2006), os monoterpenóides oxigenados e os sesquiterpenóides hidrocarbonados foram os principais constituintes identificados. A faixa de variação na percentagem dos monoterpenóides em relação às estações do ano foi da ordem de 69 a 84%, enquanto para os sesquiterpenóides esta variação

foi de 6 a 24%. Os altos índices observados para o primeiro grupo, por sua vez, denotam que a via dos monoterpenóides é predominante para produção dos compostos voláteis nesta espécie.

Ao contrário de outros estudos (ATTI-SERAFINI et al., 2002; TAVARES et al., 2004), os compostos majoritários (>15%) do óleo essencial de *Lippia alba* não foram os mesmos entre os diferentes anos de análise. Sugere-se, nesse caso, a realização de estudos agronômicos visando identificar a presença de diferentes genótipos entre as plantas cultivadas, bem como excluir a possibilidade da existência de diferentes quimiotipos.

Alguns constituintes como sabineno, 1,8-cineol, *E*-cariofileno, germacreno D, germacreno A, germacreno B e germacreno D 4-ol destacam-se por ocorrer em todas as estações (Manuscritos 1 e 2). Outros como α -pineno, canfeno, limoneno, linalol e cânfora também são notáveis, embora não ocorram em uma das estações (verão ou primavera) de um dado ano de análise (Manuscritos 1 e 2). Independente da situação, todos estes compostos são encontrados com bastante frequência no óleo essencial de *L. alba* (ALEA et al., 1996; MATOS et al., 1996; TERBLANCHÉ, KORNELIUS, 1996; FRIGHETTO, OLIVEIRA, 1998; SINGH et al., 1999; ATTI-SERAFINI et al., 2002; CASTRO, MING, MARQUES, 2002; TAVARES et al., 2004; STASHENKO, JARAMILLO, MARTÍNEZ, 2004; DUARTE et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; SILVA et al., 2006). Além disso, cabe ressaltar que, no primeiro grupo, dos cinco sesquiterpenóides citados, quatro pertencem à série dos germacranos, conhecidos por serem intermediários importantes na biossíntese de outros compostos, a exemplo daqueles com esqueleto guaino e cadinano (KRAKER et al., 1998; SILVA, 2006; FRANCESCATO, 2007).

As frequentes variações na composição do óleo essencial de *L. alba* tem levado a sua separação em quimiotipos ou raças químicas. Na tentativa de estabelecer um sistema de classificação, Hennebelle et al., 2008 propuseram a existência de sete quimiotipos e alguns sub-tipos para o óleo essencial de *L. alba*, com base na composição e na rota biossintética dos diferentes óleos. O quimiotipo I tem citral, linalol e β -cariofileno entre os principais constituintes, apresentando 4 sub-tipos. No quimiotipo II, o composto majoritário é tagetenona. Para o quimiotipo III destaca-se a presença do limoneno e quantidades variáveis de carvona ou outras cetonas monoterpênicas relacionadas (diidrocarvona, piperetona, piperetenona, lippiona). Este último quimiotipo apresenta 2 sub-tipos. Os demais quimiotipos seriam formados basicamente por mirceno (quimiotipo IV), γ -terpineno (quimiotipo V), cânfora e 1,8-cineol (quimiotipo VI) e estragol (quimiotipo VII) (HENNEBELLE, 2006; HENNEBELLE et al., 2008). De acordo com estes dados, uma provável classificação para os óleos essenciais da *L. alba* coletada em São Luiz Gonzaga seria o quimiotipo I sub-tipo “b”,

cujos principais constituintes são linalol, 1,8-cineol e germacreno D. Os próprios autores da classificação deixam claro, entretanto, que ela não está livre de imperfeições. Assim, justifica-se a importância dos estudos sobre a variabilidade e a biosíntese dos óleos essenciais, especialmente em espécies que apresentam grande potencial terapêutico como *L. alba*.

Nos últimos anos, a busca por novas drogas que combatam as infecções microbianas tornou-se uma necessidade absoluta, tendo em vista o aumento da resistência microbiana aos antibióticos e a emergência de novos microorganismos patogênicos. Os métodos comumente utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana de produtos naturais podem ser classificados em três grupos principais: difusão (em disco, em cavidades no ágar ou cilindros de aço), diluição (em ágar ou em caldo) e bioautografia. A escolha do método mais adequado é crucial, pois pode influenciar profundamente os resultados. O método de difusão, por exemplo, não é adequado para testar amostras apolares devido à dificuldade de se difundirem em um meio polar como o ágar. Na bioautografia, um dos maiores problemas é a remoção residual dos solventes utilizados para transferir a amostra para a fase estacionária da placa. Em geral, os métodos de diluição são mais apropriados para a análise de extratos e amostras apolares. Assim, dadas as características de volatilidade e lipofilia, o método de microdiluição em caldo mostrou-se mais adequado para a avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e seus constituintes isolados (BURT, 2004; LAHLOU, 2004; RÍOS, RECIO, 2005; COS et al., 2006).

As propriedades antimicrobianas de *L. alba* apresentam estreita relação com seu uso popular. Entre os principais microorganismos inibidos pelo óleo essencial desta planta podemos citar espécies do gênero *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichophyton*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Klebsiela*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fuzarium*, *Rhizopus*, entre outros (ALEA et al., 1996; DUARTE et al., 2005; SOUZA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; DUARTE et al., 2007; VERA et al., 2007; HENNEBELLE et al., 2008). Diante disso, o uso popular de *L. alba* nos casos de infecções da pele (PASCUAL et al., 2001; DI STASI et al., 2002; HENNEBELLE et al., 2008) poderia ser justificado pela atividade inibitória dos óleos essenciais contra *Staphylococcus aureus*, uma bactéria Gram-positiva encontrada na flora transitória da pele (OLIVEIRA et al., 2006). Em função dos resultados obtidos contra esta cepa (Manuscritos 2 e 3), o óleo essencial de *L. alba* surge como uma alternativa ao desenvolvimento de antimicrobianos de aplicação tópica.

Outra possível aplicação dos óleos essenciais envolve a indústria de alimentos. Fungos oportunistas como *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Fuzarium* spp., *Rhizopus* spp. são hábeis em colonizar diversos substratos, incluindo alimentos. Estes fungos produzem uma série de

metabólitos tóxicos (SOUZA et al., 2005). A presença de micotoxinas em alimentos tem sido correlacionada a várias patologias humanas, dentre elas o câncer (CALDAS, SILVA, OLIVEIRA, 2002). Embora os estudos nesse campo de pesquisa ainda sejam incipientes com a espécie *L. alba*, os óleos essenciais em geral representam uma alternativa promissora na conservação dos alimentos (BURT, 2004; HOLLEY, PATEL, 2005), principalmente nos dias de hoje, em que a busca por hábitos mais saudáveis tem pressionado a redução dos conservantes alimentícios artificiais.

Tradicionalmente, as folhas ou as raízes de *L. alba* são preparadas por infusão ou decocção (DI STASI et al., 2002; BARROS et al., 2007), sendo comumente utilizada água como solvente extrator. Neste modo de preparo, substâncias polares e não voláteis são preferencialmente extraídas. Assim, do mesmo modo que os compostos voláteis, tais substâncias contribuiriam para a explicação dos efeitos e/ou indicações medicinais da planta.

De fato, muitos extratos de caráter polar ou de média polaridade apresentam atividades farmacológicas interessantes (HENNEBELLE et al., 2008). O macerado hidroalcoólico das folhas de *L. alba*, por exemplo, demonstrou atividade contra algumas espécies de *Candida* spp. pelo método de microdiluição em caldo (HOLETZ et al., 2002). Pela técnica de diluição em ágar, os extratos aquoso e metanólico das partes aéreas provocaram a inibição do crescimento de *Escherichia coli*, bem como a inibição do crescimento de microorganismos do gênero *Shigella* e *Salmonella* (ALANIS et al., 2005). O extrato etanólico das folhas, por sua vez, foi ativo contra *Staphylococcus aureus* pelos métodos de difusão e bioautografia (VALGAS et al., 2007). Paralelamente, usando o método de difusão em cavidades no ágar, Sena Filho et al., 2006 demonstraram a atividade antimicrobiana dos extratos acetato de etila e metanol das raízes de *L. alba* contra *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. Na triagem fitoquímica foram detectadas a presença de terpenóides, fenilpropanóides e açúcares (SENA FILHO et al., 2006).

Aos fenilpropanóides pertence uma classe importante de metabólitos secundários isolados em *L. alba*: os flavonóides (HENNEBELLE et al., 2006; HENNEBELLE et al., 2008). Em geral, estes metabólitos também podem apresentar atividade antimicrobiana. Seus mecanismos de ação envolvem inibição da síntese de ácidos nucléicos, inibição das funções da membrana citoplasmática e inibição do metabolismo energético (CUSHNIE, LAMB, 2005). Dessa forma, é possível supor que os flavonóides também contribuam para a atividade antimicrobiana decorrente do uso desta planta.

Entre outros metabólitos isolados em *L. alba* destacam-se ainda os iridóides (BARBOSA et al., 2006; HENNEBELLE et al., 2008). Estes compostos apresentam

importância como marcadores taxonômicos no gênero *Lantana*, *Lippia*, *Aloysia* e *Phyla*. Os iridóides freqüentemente encontrados no gênero *Lippia* são o tevesideo e teviridosideo (RIMPLER, SAUERBIER, 1986; VON POSER et al., 1997; HENNEBELLE et al., 2008). De modo geral, as atividades biológicas atribuídas aos iridóides incluem hepatoproteção, atividade antineoplásica, imunoestimulante e antileishmania (MANDAL, JAIN, MUKHOPADHYAY, 1998).

Apesar dos vários estudos sobre a composição e a atividade farmacológica dos óleos essenciais de *L. alba*, são poucos aqueles que visam determinar os constituintes bioativos. As técnicas de fracionamento bio-guiado são bastante úteis nesse caso, pois o fracionamento e a purificação das amostras (ex.: extratos ou óleos essenciais) são direcionados para a obtenção de frações onde possivelmente estão concentrados os compostos responsáveis pela atividade biológica. O isolamento e identificação do germacreno D-4-ol, cuja atividade antimicrobiana foi demonstrada neste estudo, confirmam estas impressões (Manuscrito 3).

Uma vantagem particular da aplicação das técnicas cromatográficas e espectrométricas (ex.: cromatografia em coluna de gel de sílica) para os óleos essenciais é o eventual isolamento de compostos com estrutura desconhecida ou cuja identidade é de difícil caracterização pelos métodos convencionais de análise (GC, GC-EM, índice de Kovats) (BROCHINI et al., 1999; BROCHINI, LAGO, 2007). Um bom exemplo deste fato foi a caracterização de compostos como miternal, β -elemeno, α -gurjuneno, *allo*-aromadendreno, γ -muuruleno e γ -cadineno somente após o fracionamento do óleo essencial (Manuscrito 3). A explicação mais provável, no entanto, tem relação com a redução do número de constituintes nas frações, em comparação com o óleo essencial total.

Paralelamente, o isolamento e a caracterização do(s) constituinte(s) bioativo(s) constituem etapas importantes para o controle de qualidade de uma planta. Sem este conhecimento, por exemplo, não é possível desenvolver metodologias para o doseamento das substâncias ativas presentes na droga vegetal ou nos produtos dela derivados (FRASSON, BITTENCOURT, HEINZMANN, 2003). Assim, tendo em vista que o germacreno D-4-ol é um dos responsáveis pela atividade antimicrobiana em *L. alba* (Manuscrito 3), sugere-se futuramente o seu uso como marcador químico e biológico.

O sesquiterpenóide germacreno D-4-ol também é encontrado em outras espécies vegetais. No gênero *Lippia*, foi detectada a sua presença no óleo essencial de *L. citriodora* e *L. javanica* (VILJOEN et al., 2005; ARGYROPOULOU et al., 2007). No gênero *Senecio*, ele está presente no óleo essencial de *S. ceratophylloides* e *S. crassiflorus* variedade *crassiflorus*, plantas de reconhecida toxicidade devido à presença dos alcalóides pirrozilidínicos, cujos

óleos essenciais apresentam atividade antimicrobiana (BOLZAN et al., 2007; FRANCESCATO, 2007; MURARI, 2007). Em batatas (*Solanum tuberosum*), a emissão do germacreno D-4-ol esta associada à ocorrência de danos mecânicos e ataque de herbívoros (WEISSBECKER et al., 2000; HARMEL et al., 2007). Com exceção deste papel biológico, não consta na literatura outros dados sobre a atividade farmacológica ou terapêutica do germacreno D-4-ol. Este trabalho, portanto, é o primeiro a relatar a sua atividade antimicrobiana (Manuscrito 3).

Apesar dos resultados prévios descritos na literatura (HAMMER, CARSON, RILEY, 2003; SKAL TSA et al., 2003; RÍOS et al., 2003; SIBANDA et al., 2004; SETZER et al., 2006; ZYL, SEATLHOLO, VUUREN, 2006; COX, MARKHAM, 2007; VAGIONAS et al., 2007), neste estudo o linalol não demonstrou atividade antimicrobiana (Manuscrito 3). O motivo desta discrepância pode estar relacionado à falta de uniformidade entre os métodos de microdiluição em caldo pesquisados. Os principais pontos de diferenciação, nesse caso, são a origem do composto, o solvente ou agente emulsificante utilizado, as diferentes cepas ATCC empregadas para um microorganismo da mesma espécie, a faixa de concentração testada, bem como os níveis de aceitação sobre o que é ou não considerado ativo. Tais diferenças revelam ainda uma necessidade antiga de padronização dos métodos (RÍOS et al., 2005), a fim de que os resultados possam ser efetivamente comparados.

Em compensação, outras atividades farmacológicas são descritas para o linalol. Destacam-se, nesse sentido, as atividades antiinflamatória, antinociceptiva, sedativa e ansiolítica. Mecanismos opioidérgicos, colinérgicos e dopaminérgicos parecem estar envolvidos nos efeitos antinociceptivos do linalol, uma vez que tais efeitos são revertidos pela co-administração da naloxona (um antagonista dos receptores opióides), da atropina (um antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos) e da sulpirida (um antagonista dos receptores dopaminérgicos). Outro mecanismo possível é o bloqueio dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). Tais receptores têm como principais neurotransmissores os aminoácidos excitatórios (aspartato e glutamato), os quais exercem uma ampla gama de ações fisiológicas, a exemplo do processamento das informações sensoriais. O linalol é um antagonista competitivo do receptor NMDA, o que explicaria os efeitos antinociceptivos observados para esse composto. Foi demonstrado também que o linalol inibe a síntese e liberação do óxido nítrico (NO), um importante mediador inflamatório e nociceptivo. Adicionalmente, o efeito inibitório do linalol sobre a ligação do glutamato a receptores situados no córtex cerebral em ratos pode explicar, pelo menos em parte, o efeito sedativo e

ansiolítico (ELISABETSKY, MARSCHNER, SOUZA, 1995; PEANA et al., 2002; SILVA, 2002; PEANA et al., 2003; PEANA et al., 2006; UMEZU et al., 2006).

O monoterpênóide linalol é encontrado amplamente em plantas aromáticas. No gênero *Lippia*, por exemplo, ele está presente no óleo essencial de *L. multiflora*, *L. affinis aristata*, *L. aristata*, *L. carviadora*, *L. chamedrifolia*, *L. citriadora*, *L. dulcis*, *L. fissicalyx*, *L. graveolens*, *L. grisebachiana*, *L. intergrifolia*, *L. javanica*, *L. nodiflora*, *L. origanoides*, *L. turbinata*, *L. wilmsii*, entre outras (TERBLANCHÉ, KORNELIUS, 1996; PASCUAL et al 2001). O papel biológico do linalol, por sua vez, está relacionado à atração de polinizadores, proteção a danos mecânicos e ao ataque de herbívoros (PICHERSKY et al., 1994; RAGUSO, PICHERSKY, 1999; ZABARAS, WYLLIE, 2001).

Na indústria, o principal uso do linalol é na fabricação de perfumes e na síntese de vitaminas (A e E). Na figura abaixo estão representadas algumas etapas da síntese da vitamina E a partir do linalol (Figura 18) (MERCIER, CHABARDES, 1994). Tradicionalmente, o linalol é o principal constituinte obtido de uma árvore amazônica conhecida como pau-rosa (*Aniba* spp.) (MAIA et al., 2007). A exploração contínua desta planta, no entanto, tem agravado o seu processo de extinção. Alternativamente, *L. alba* tem sido citada como uma provável fonte para obtenção de linalol (FRIGHETTO, OLIVEIRA, 1998; RAGUSO, PICHERSKY, 1999), dado o alto rendimento deste constituinte na espécie.

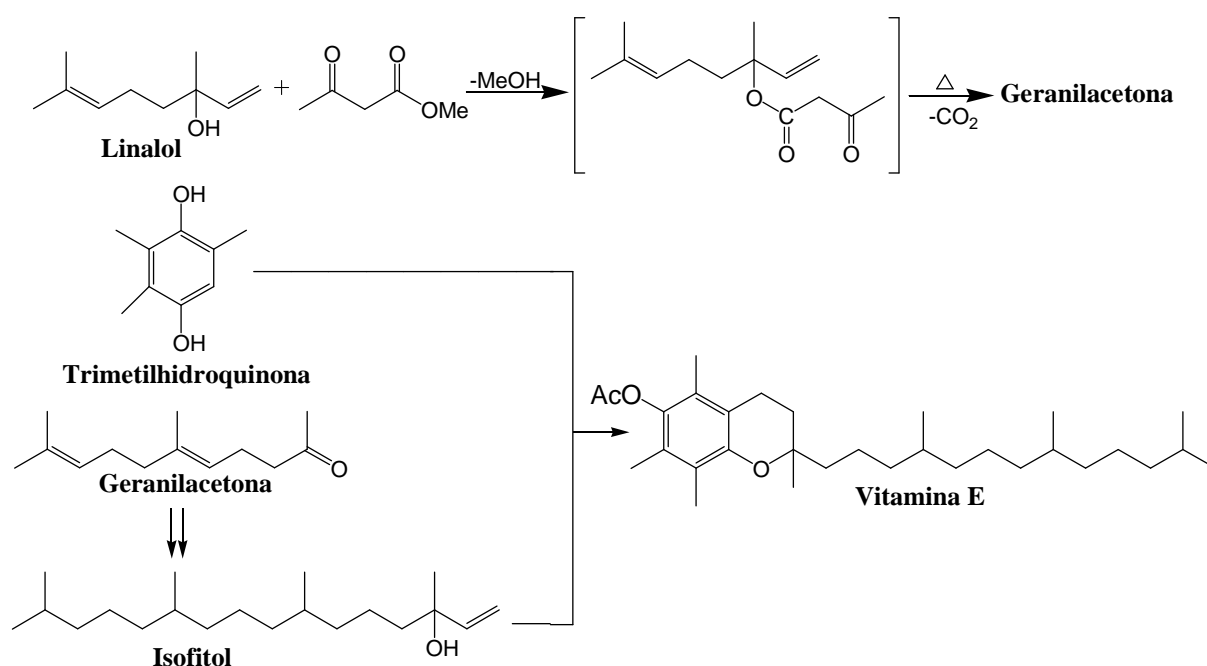


Figura 18: Síntese da vitamina E a partir do linalol (Adaptado de: MERCIER, CHABARDES, 1994).

6 CONCLUSÕES

- ✓ O óleo essencial de *Lippia alba* apresentou variabilidade qualitativa e semi-quantitativa em relação as estações do ano.
- ✓ O rendimento do óleo essencial variou na ordem de 0,3 a 0,6%. Os teores mais elevados foram observados no verão, outono e primavera, enquanto os menores rendimentos ocorreram no inverno.
- ✓ O óleo essencial foi composto de monoterpenóides e sesquiterpenóides, sendo a maioria deles oxigenados. A faixa de variação na percentagem dos monoterpenóides em relação às estações do ano foi da ordem de 69 a 84%, enquanto que, para os sesquiterpenóides, esta variação foi de 6 a 24%.
- ✓ Os compostos majoritários (>15%) do óleo essencial não foram os mesmos nos diferentes anos de análise.
- ✓ A variabilidade sazonal influenciou a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais.
- ✓ O óleo essencial apresentou atividade antimicrobiana frente aos seguintes microorganismos nas concentrações entre 100 e 6400 µg/mL: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031; *Candida albicans* ATCC 44773; *Candida glabrata* (isolado clínico); *Prototheca zoopfi* (isolado clínico); *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 28952.
- ✓ Nas concentrações testadas, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 não apresentou suscetibilidade aos óleos essenciais.
- ✓ Entre os fungos, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 28952 foi o mais sensível, com CIM e CFM de 800 µg/mL para o óleo obtido em janeiro. Com relação às cepas bacterianas, as mais sensíveis foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, com

CIM de 800 $\mu\text{g/mL}$ e CBM de 1600 $\mu\text{g/mL}$ para os óleos essenciais obtidos em abril e julho, e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, com CIM e CBM de 1600 $\mu\text{g/mL}$ para o óleo extraído em julho.

- ✓ Como o potencial antibacteriano e antifúngico foi maior em julho e em janeiro, respectivamente, em termos de atividade antimicrobiana, o inverno e o verão constituem a melhor época para a coleta e extração dos óleos essenciais.
- ✓ O fracionamento bio-guiado do óleo essencial mostrou que as frações contendo maiores quantidades de compostos oxigenados são potencialmente mais ativas do que aquelas contendo compostos hidrocarbonados.
- ✓ O fracionamento bio-guiado do óleo essencial permitiu o isolamento e a identificação do germacreno D-4-ol como um dos compostos responsáveis pela sua atividade antimicrobiana. O rendimento deste sesquiterpenóide foi 0,54% em relação ao óleo.
- ✓ Germacreno D-4-ol apresentou atividade antimicrobiana contra *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 28952 (CIM = CFM = 200 $\mu\text{g/mL}$), *Prototheca zoopfi* (isolado clínico) (CIM = CFM = 400 $\mu\text{g/mL}$) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CIM = CBM = 800 $\mu\text{g/mL}$).
- ✓ Também foi possível isolar e identificar o linalol. O rendimento deste monoterpenóide em relação ao óleo essencial foi de 0,89%.
- ✓ O linalol não demonstrou atividade antimicrobiana nas concentrações entre 50 e 3200 $\mu\text{g/mL}$ frente aos seguintes microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Prototheca zoopfi* (isolado clínico); *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 28952.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABENA, A. A.; DIATEWA, M.; GAKOSSO, G.; GBEASSOR, M.; HONDI-ASSAH, T. H.; OUAMBA, J. M. Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of essential oil of *Lippia multiflora*. **Fitoterapia** v. 74, p. 231-236, 2003.

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

ALANIS, A. D.; CALZADA, F.; CERVANTES, J. A.; TORRES, J.; CEBALLOS, G. M. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 153-157, 2005.

ALEA, J. A. P.; LUIS, A. G. O.; PÉREZ, A. R.; JORGE, M. R.; BALUJA, R. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 30, n. 1, 1996.

ARGYROPOULOU, C.; DAFERERA, D.; TARANTILIS, P. A.; FASSEAS, C.; POLISSIOU, M. Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H.B.K. (Verbenaceae) at two developmental stages. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 831-837, 2007.

ATTI-SERAFINI, L.; PANSERA, M. R.; ATTI-SANTOS, A. C.; ROSSATO, M.; PAULETTI, G. F.; ROTA, L. D.; PAROUL, N.; MOYNA, P. Variation in essential oil yield and composition of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. grown in southern Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, p. 72-74, 2002.

BACHILLER, F. A. S.; ECHEVARRÍA, M. J.; GONZÁLEZ, O. E. G.; RODRIGUEZ, M. F. A.; MELÉNDEZ, P. A.; RAMSEY, L. R. Terpenoid composition of *Lippia dulcis*. **Phytochemistry**. v. 44, p. 1077-1086, 1997.

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

BARA, M. T. F.; RIBEIRO, P. A. M.; ARANTES, M. C. B.; AMORIM, L. L. S. S.; PAULA, J. R. Determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n. 2, p. 211-215, 2006.

BARBOSA, F. F.; BARBOSA, L. C. A.; MELO, E. C.; BOTELHO, F. M.; SANTOS, R. H. S. Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1221-1225, 2006.

BARBOSA, F. G.; LIMA, M. A. S.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E. R. Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Lippia alba*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 819-821, 2006.

BARBOSA, F. G.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Total NMR assignment of new [C7-O-C7] biflavones from leaves of the limonene-carvone chemotype of *Lippia alba*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, n. 4, p. 334-338, 2005.

BARROS, F. M. C.; PEREIRA, K. N.; ZANETTI, G. D.; HEINZMANN, B. M. Plantas de uso medicinal no município de São Luiz Gonzaga, RS, Brasil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 652-662, 2007.

BASSOLE, I. H. N.; OUATTARA, A. S.; NEBIE, R.; OUATTARA, C. A. T.; KABORE, Z. I.; TRAORE, S. A. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. **Phytochemistry**, v. 62, p. 209-212, 2003.

BIANCO, A. Recent developments in iridoids chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, n. 10/11, p. 2335-2338, 1994.

BIASI, L. A.; COSTA, G. Propagação vegetativa de *Lippia alba*. **Ciência Rural**, v. 33, n. 3, p. 455-459, 2003.

BOLZAN, A. A.; SILVA, C. M.; FRANCESCATO, L. N.; MURARI, A. L.; SILVA, G. N. S.; HELDWEIN, C. G.; HEINZMANN, B. M. Espécies de *Senecio* na medicina popular da América Latina e toxicidade relacionada a sua utilização. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 4, p. 619-625, 2007.

BRAGA, M. E. M.; EHLERT, P. A. D.; MING, L. C.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract chemical composition. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, p. 149-156, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisa de plantas medicinais da Central de Medicamentos**. (Série B. Textos Básicos de Saúde). Brasília, 2006. 148 p.

BROCHINI, C. B.; LAGO, J. H. G. Aplicação de técnicas cromatográficas e espectrométricas como ferramentas de auxílio na identificação de componentes de óleos voláteis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 266-270, 2007.

BROCHINI, C. B.; NÚÑEZ, C. V.; MOREIRA, I. C.; ROQUE, N. F.; CHAVES, M. H.; MARTINS, D. Identificação de componentes de óleos voláteis: análise espectroscópica de misturas de sesquiterpenos. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 37-40, 1999.

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

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 319-23, 2002.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, 2000.

CARVALHO, A. F. U.; MELO, V. M. M.; CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L.; BANTIM, A. B.; RABELO, E. F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. Against *Aedes aegypti* Linn. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 569-571, 2003.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2003. p. 519-535.

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

CORRÊA, C. B. V. Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britt. & Wilson – erva cidreira. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 73, n. 3, p. 57-64, 1992.

COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 290-302, 2006.

COSTA, S. M. O.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; ASSUNÇÃO, J. C. C.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 66-67, 2002.

COX, S. D.; MARKHAM, J. L. Susceptibility and intrinsic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to selected plant volatile compounds. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 930-936, 2007.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Eds.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1318.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES, M. A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O. S.; KAKINAMI, S. H.; REIS, M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, p. 69-91, 2002.

DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y. Naturally occurring iridoids. A Review, Part 1. **Chemical Pharmacological Bulletin**, v. 55, n. 2, p. 159-222, 2007.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

DUARTE, M. C. T.; LEME, E. E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A. A.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 197-201, 2007.

EHLERT, P. A. D. **Épocas de plantio, idades e horários de colheita na produção e qualidade do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br., quimiotipo limoneno-carvona**. 2003. 125f. Tese (Doutorado em agronomia – Área de concentração em horticultura) – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, SP, 2003.

ELISABETSKY, E.; MARSCHNER, J.; SOUZA, D. O. Effects of linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex. **Neurochemical Research**, v. 20, n. 4, 1995.

FARDELONE, L. C.; BRANCHI, B. A. Mudanças recentes no mercado farmacêutico. **Revista da FAE**, v. 9, n. 1, p. 139-152, 2006.

FARIAS, M. R.; SCHENKEL, E. P.; BERGOLD, A. M.; PETROVICK, P. R. O problema da qualidade dos fitoterápicos. **Caderno de Farmácia**, v. 1, n. 2, p. 73-82, 1985.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4^o ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

FARMAPOLIS. Fórum de assistência farmacêutica. Termo de referência. In: **Caderno de resumos dos trabalhos científicos**, 2004, p. 6-13.

FARNSWORTH, N. R. et al. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, n. 6, p. 965-981, 1985.

FRANCESCATO, L. N. **Constituintes de *Senecio heterotrichius* DC.: Isolamento, elucidação estrutural, derivatização e avaliação da atividade antimicrobiana; Estudo dos constituintes voláteis de outras espécies de *Senecio***. 2007. 154f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2007.

FRASSON, A. P. Z.; BITTENCOURT, C. F.; HEINZMANN, B. M. Caracterização físico-química e biológica do caule de *Caesalpinia ferrea* Mart. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 1, p. 35-39, 2003.

FRIGHETTO, N.; OLIVEIRA, J. G. *Lippia alba* Mill N. E. Br. (Verbenaceae) as a source of linalol. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, p. 578-580, 1998.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 178-182, 2005.

GIRÃO, V. C. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; MORAIS, S. M.; SEQUEIRA, J. L.; GIOSO, M. A. A clinical trial of the effect of a mouth-rinse prepared with *Lippia sidoides* Cham essential oil in dogs with mild gingival disease. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 59, p. 95-102, 2003.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOMES, E. C. G.; MING, L. C.; MOREIRA, E. A.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; KERBER, V. A.; CONTI, A.; WEISS FILHO, A. Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 74, n. 2, p. 29-32, 1993.

GRODNITZKY, J. A.; COATS, J. R. QSAR Evaluation of monoterpenoids' insecticidal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4576-4580, 2002.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2003. p. 13-28.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 853-860, 2003.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HARMEL, N.; MOHAMAD, R.; FAUCONNIER, M. L.; JARDIN, P.; VERHEGGEN, F.; MARLIER, M.; HAUBRUGE, E.; FRANCIS, F. Role of terpenes from aphid-infested potato on searching and oviposition behavior of *Episyrphus balteatus*. **Insect Science**, v. 14, p. 57-63, 2007.

HEGDE, V. R.; PU, R.; PATEL, M.; DAS, P. R.; STRIZKI, J.; GULLO, V. P.; CHOU, C.; BUEVICH, ALEXEI V.; CHAN T. Three new compounds from the plant *Lippia alva* as inhibitors of chemokine receptor 5 (CCR5). **Biorgananic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 14, p. 5339-5342, 2004.

HEINZMANN, B. M.; BARROS, F. M. C. Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo *Lippia alba* (MILL.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Revista do Centro de Ciências da Saúde**, Santa Maria, v. 33, p. 43-48, 2007.

HENNEBELLE, T. **Investigation chimique, chimiotaxonomique, et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants: *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées)**. 2006. 204f. Thèse (Doctorat – Chimie Organique et Macromoléculaire) – Lille 1, 2006.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, 211-222, 2008.

HENRIQUES, A. T.; SIMÕES-PIRES, C. A.; APEL, M. A. Óleos essenciais: Importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. (org.). **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2007. p. 210-235.

HERNÁNDEZ, T.; CANALES, M.; AVILA, J. G.; DURAN, A.; CABALLERO, J.; VIVAR, A. R.; LIRA, R. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 181-188, 2003.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-31, 2002.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 22, p. 273-292, 2005.

JULIANI JR, H. R.; KOROCH, A. R.; JULIANI, H. R.; TRIPPI, V. S.; ZYGADLO, J. A. Intraspecific variation in leaf oils of *Lippia junelliana* (mol.) tronc. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 163-170, 2002.

KANKO, C.; KOUKOUA, G.; N'GUESSAN, Y. T.; FOURNIER, J.; PRADÈRE, J.; TOUPET, L. Contribution à l'étude phytochimique de *Lippia multiflora* (Verbenaceae). **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, p. 1029-1032, 2004.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 206-220, 2005.

KRAKER, J.; FRANSSSEN, M. C. R.; GROOT, A.; KÖNIG, W. A.; BOUWMEESTR, H. J.; (+)-Germacrene A biosynthesis. The committed step in the biosynthesis of bitter sesquiterpene lactones in chicory. **Plant Physiology**, v. 117, p. 1381-1392, 1998.

KUNLE, O.; OKOGUN, J.; EGAMANA, E.; EMOJEVWE, E.; SHOK, M. Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. **Phytomedicine**, v. 10, p. 59-61, 2003.

LAHLOU, M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 435-448, 2004.

LUAN, F.; WÜST, M. Differential incorporation of 1-deoxy-d-xylulose into (3S)-linalool and geraniol in grape berry exocarp and mesocarp. **Phytochemistry**, v. 60, p. 451–459, 2002.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; COUTO, H. A. R.; SILVA, A. C. M.; MARX, F.; HENKE, C. Plant of Amazon rosewood. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1906-1910, 2007.

MANDAL, S.; JAIN, R.; MUKHOPADHYAY, S. Naturally occurring iridoids with pharmacological activity. **Indian Journal Pharmaceutical Science**, v. 60, n. 3, p. 123-127, 1998.

MANENZHE, N. J.; POTGIETER, N.; REE, T. Composition and antimicrobial activities of volatile components of *Lippia javanica*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2333-2336, 2004.

MARCHESE, J. A.; FIGUEIRA, G. M. O uso de tecnologias pré e pós-colheita e boas práticas agrícolas na produção de plantas medicinais e aromáticas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n. 3, p. 86-96, 2005.

MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W. Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in northeast Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, p. 695-698, 1996.

MELO, J. G.; NASCIMENTO, V. T.; AMORIM, E. L. C.; ANDRADE LIMA, C. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo (*Peumus boldus* Molina), pata-de-vaca (*Bauhinia spp.*) e ginko (*Ginkgo biloba* L.). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, 2004.

MENDES, B. G.; MACHADO, M. J.; FALKENBERG, M. Triagem de glicolipídios em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 568-575, 2006.

MERCIER, C.; CHABARDES, P. Organometallic chemistry in industrial vitamin A and vitamin E synthesis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, n. 7, p. 1509-1518, 1994.

MURARI, A. L. **Constituintes voláteis e atividade antimicrobiana de *Senecio crassiflorus* (Poir.) DC. Var. *crassiflorus***. 2007. 140f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2007.

NAGAO, E. O.; INNECCO, R.; MATTOS, S. H.; MEDEIROS FILHO, S.; MARCO, C. A. Efeito do horário de colheita sobre o teor e constituintes majoritários de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N. E. Br., quimiotipo citral-limoneno. **Revista Ciência Agronômica**, v. 35, n. 2, p. 355-360, 2004.

NANGIA, A.; PRASUNA, G.; RAO, P. B. Synthesis of cyclopenta[C]pyran skeleton of iridoid lactones. **Tetrahedron**, v. 53, n. 43, p. 14507-14545, 1997.

NATERCIA, F. Parcerias e inovação impulsionam setor farmacêutico. **Inovação Uniemp**, v. 1, n. 4, 2005.

OLADIMEJI, F. A.; ORAFIDIYA, L. O.; OKEKE, I. N. Physical properties and antimicrobial activities of leaf essential oil of *Lippia multiflora* Moldenke. **The International Journal of Aromatherapy**. v. 14, p. 162-168, 2004.

OLADIMEJI, F. A.; ORAFIDIYA, O. O.; OGUNNIYI, T. A. B.; ADEWUNMI, T. A. Pediculocidal and scabicial properties of *Lippia multiflora* essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**. v.72, p. 305-311, 2000.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; SANTOS, S. S.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S.; LEITÃO, S. G. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 103-108, 2006.

OLIVEIRA, F. P.; LIMA, E. O.; JÚNIOR, J. P. S.; SOUZA, E. L.; SANTOS, B. H. C.; BARRETO, H. M. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 510-516, 2006.

OMOLO, M.O.; OKINYO, D.; NDIEGE, I.O.; LWANDE, W.; HASSANALI, A. Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. **Phytochemistry**. v.65, p. 2797-2802, 2004.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, M. E.; MATA, D. S.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.

PEANA, A. T.; D'AQUILA, P. S.; CHESSA, M. L.; MORETTI, M. D. L.; SERRA, G.; PIPPIA, P. (-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 460, p. 37– 41, 2003.

PEANA, A. T.; D'AQUILA, P. S.; PANIN, F.; SERRA, G.; PIPPIA, P.; MORETTI, M. D. L. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. **Phytomedicine**, v. 9, p. 721–726, 2002.

PEANA, A. T.; MARZOCCO, S.; POPOLO, A.; PINTO A. (-)-Linalool inhibits in vitro NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. **Life Sciences**, v. 78, p. 719-723, 2006.

PICHERSKY, E.; RAGUSO, R. A.; LEWINSOHN, E.; CROTEAU, R. Floral Scent Production in *Clarkia* (Onagraceae). **Plant Physiology**, v. 106, p. 1533- 1540, 1994.

PROESTOS, C.; SERELI, D.; KOMAITIS, M. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. **Food Chemistry**, v. 95, p. 44-52, 2006.

PROSSER, I.; PHILLIPS, A. L.; GITTINGS, S.; LEWIS, M. J.; HOOPER, A. M.; PICKETT, J. A.; BEALE, M. H. (+)-(10*R*)-Germacrene A synthase from goldenrod, *Solidago canadensis*; cDNA isolation, bacterial expression and functional analysis. **Phytochemistry**, v. 60, n. 7, p. 691-702, 2002.

RAGUSO, R. A.; PICHERSKY, E. A day in life a linalool molecule: chemical communication in a plant-pollinator system. Part 1: linalool biosynthesis in flowering plants **Plant Species Biology**, v. 14, p. 95-120, 1999.

RASTRELLI, L.; CACERES, A.; MORALES, C.; SIMONE, F.; AQUINO, R. Iridoids from *Lippia graveolens*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 1829-1832, 1998.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603–613, 2001a.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino da farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.11, n. 2, p. 57-69, 2001b.

RIMPLER, H.; SAUERBIER, H. Iridoid glucosides as maskers in the genera *Lantana*, *Lippia*, *Aloysia* e *Phyla*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, n. 3, p. 307-310, 1986.

RÍOS, J. L; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80-84, 2005.

RÍOS, M. Y.; CASTREJÓN, F.; ROBLEDO, N.; LEÓN, I.; ROJAS, G.; NAVARRO, V. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Annona cherimola* (Annonaceae). **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 47, p. 139-142, 2003.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiocologia**. São Paulo: Editorial Premier, 1997. 372 p.

SAMPAIO-SANTOS, A. M. I.; KAPLAN, M. A. Biosynthesis significance of iridoids in chemosystematics. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 2, p. 144-153, 2001.

SANGWAN, N. S.; FAROOQI, A. H. A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R. S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 3–21, 2001.

SANTOS, M. R. A.; INNECCO, R.; SOARES, A. A. Caracterização anatômica das estruturas secretoras e produção de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. em função do horário de colheita nas estações seca e chuvosa. **Revista Ciência Agronômica**, v. 35, n. 2, p. 377-383, 2004.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2003. p. 403-434.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2003. p. 371-400.

SENA FILHO, J. G.; MELO, J. G. S.; SARAIVA, A. M.; GONÇALVES, A. M.; PSIOTTANO, M. N. C.; XAVIER, H. S. Antimicrobial activity and phytochemical profile from the roots of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 506-509, 2006.

SETZER, W. N.; SCHMIDT, J. M.; NOLETTO, J. A.; VOGLER, B. Leaf oil compositions and bioactivities of Abaco bush medicines. **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 794-802, 2006.

SIBANDA, S.; CHIGWADA, G.; POOLE, M.; GWEBU, E. T.; NOLETTO, J. A.; SCHMIDT, J. M.; REA, A. I.; SETZER, W. N. Composition and bioactivity of the leaf essential oil of *Heteropyxis dehniae* from Zimbabwe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 107–111, 2004.

SILVA, C. M. **Sesquiterpenóides de *Senecio bonariensis* Hook. et Arn.** 2006. 134f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2006.

SILVA, N. A.; OLIVEIRA, F. F.; COSTA, L. C. B.; BIZZO, H. R.; OLIVEIRA, R. A. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.)

cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 52-55, 2006.

SILVA, P. **Farmacologia**. 6º edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 2002.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos**. 6º edição. Editora LTC, Rio de Janeiro, 2000. 460 p.

SIMIONATTO, E. **Estudos dos constituintes químicos de óleos voláteis de plants medicinais do Rio Grande do Sul: isolamento, determinação e modificação estrutural e atividade biológica**. 2004. 232f. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2003. p. 467-495.

SINGH, G.; PANDEY, S. K.; LECLERCQ, P. A.; SPERKOVA, J. Studies on essential oils. Part 15. GC/MS analysis of chemical constituents of leaf oil of *Lippia alba* (Mill.) form North India. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, p. 206-208, 1999.

SKAL TSA, H. D.; DEMETZOS, C.; LAZARI, D.; SOKOVIC, M. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. **Phytochemistry**, v. 64, p. 743-752, 2003.

SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit-sharing: perspectives from the field. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 1-15, 1996.

SOUZA, E. L.; LIMA, E. O.; FREIRE, K. R. L.; SOUSA, C. P. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 245-250, 2005.

SOUZA, J. A.; MIRANDA, E. M. **Plantas medicinais e fitoterápicos: Alternativas viáveis**. Artigos da Embrapa Acre, 2003. Disponível em: <http://www.cpfac.embrapa.br/chefias/cna/artigos/planmed.htm>. Acesso em: 08/04/2007.

STASHENKO, E. E.; JARAMILLO, B. E.; MARTÍNEZ, J. R. Comparison of different extraction methods for analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, p. 93-103, 2004.

STÜKER, C. Z. **Estudo dos óleos voláteis de plantas medicinais da família Asteraceae do Rio Grande do Sul: *Baccharidastrum triplinervium*, *Baccharis pentodonta*, *Pluchea sagittalis* e *Eupatorium buniifolium***. 2007. 129f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2007.

TAVARES, E. S.; JULIÃO, L. S.; LOPES, D.; BIZZO, H. R.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 1-5, 2005.

TERBLANCHÉ, F. C.; KORNELIUS, G. Essential constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae) – A literature review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, p. 471-485, 1996.

TISSERAND, R. Essential oil safety I. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 7, n. 3, p. 28-32, 1996.

TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para o tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, n. 3, 301-304, 2003.

UMEZU, T.; NAGANO, K.; ITO, H.; KOSAKAI, K.; SAKANIWA, M.; MORITA, M. Anticonflict effects of lavender oil and identification of its active constituents. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 85, 713–721, 2006.

VAGIONAS, K.; GRAIKOU, K.; NGASSAPA, O.; RUNYORO, D.; CHINOU I. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of three *Satureja* species growing in Tanzania. **Food Chemistry**, v. 103, p. 319–324, 2007.

VALENTIN, A.; PÉLISSIER, Y.; BENOIT, F.; MARION, C.; KONE, D.; MALLIE, M.; BASTIDE, J.M.; BESSIÈRE, J.M. Composition and antimalarial activity in vitro of volatile components of *Lippia multiflora*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 1439-1442, 1995.

VALGAS, C.; SOUZA, S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JR., A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 369-380, 2007.

VERA, J. R.; PASTRANA, P. F.; FERNÁNDEZ, K.; VIÑA, A. Actividad antimicrobiana in vitro de volátiles de *Lippia alba* y extractos orgánicos y acuoso de *Lusticia pectoralis* cultivadas em diferentes pisos térmicos del departamento del Tolima. **Scientia Et Technica**, v. 13, p. 345-348, 2007.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discovery Today**, v. 3, n. 5, p. 232-238, 1998.

VILJOEN, A. M.; SUBRAMONEY, S.; VUUREN, S. F.; BASER, K. H. C.; DEMIRCI, B. The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 96, p. 271-277, 2005.

VIT, P.; SILVA, B.; MELÉNDEZ, P. *Lippia alba* N. E. Br. Ficha botánica de interés apícola en Venezuela, No. 2 Cidrón. **Revista de la Facultad de Farmacia**, v. 43, p. 13-14, 2002.

VON POSER, G. L.; SOBRAL, M.; TOFFOLI, M. E. G.; HENRIQUES, A. T. Implicações taxonômicas de iridóides em Verbenaceae. **Caderno de Farmácia**, v. 13, n. 2, p. 169-172, 1997.

WAGNER, H. **Pharmazeutische Biologie**. 5 Aufl. Vol 2: Drogen und ihre Inhaltsstoffe. Stuttgart: Gustav Fischer, 1993. 522p.

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 239-254, 1996.

WEISSBECKER, B.; VAN LOON, J. J. A.; POSTHUMUS, M. A.; BOUWMEESTER, H. J.; DICKE, M. Identification of volatile potato sesquiterpenoids and their olfactory detection by two-spotted stinkbug *Perillus bioculatus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 6, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO Traditional Medicine Strategy 2002–2005**. Geneva, 2002. 74 p.

YAMAMOTO, P. Y. **Interação genótipo x ambiente na produção e composição de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.** 2006. 78f. Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical. Campinas, SP, 2006.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, 147-152, 2001.

ZABARAS, D.; WYLLIE, S. G. The effect of mechanical wounding on the composition of essential oil from *Ocimum minimum* L. leaves. **Molecules**, v. 6, p. 79-86, 2001.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2003. p. 577-614.

ZYL, R. L.; SEATLHOLO, S. T.; VUUREN, S. F. The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, p. 129-133, 2006.

8 ANEXO

8.1 Artigo 1

HEINZMANN, B. M.; BARROS, F. M. C. Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Revista do Centro de Ciências da Saúde**, Santa Maria, v. 33, p. 43-48, 2007.

**POTENCIAL DAS PLANTAS NATIVAS BRASILEIRAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE
FITOMEDICAMENTOS TENDO COMO EXEMPLO *LIPPIA ALBA* (MILL.)
N. E. BROWN (VERBENACEAE)**

***Potential of Brazilian native plants for the development of phytomedicines
having *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) as example***

Berta Maria Heinzmann¹ e Francisco Maikon Correa de Barros²

RESUMO

O artigo aborda a potencialidade das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fármacos e matérias-primas farmacêuticas. Aspectos relacionados à biodiversidade, à aceitabilidade do uso de plantas medicinais, ao mercado econômico, ao processo de desenvolvimento de fitomedicamentos ou fitoterápicos, bem com alguns tópicos sobre a legislação envolvida são abordados. Para mostrar esse potencial, *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae), uma espécie medicinal nativa conhecida popularmente como erva-cidreira ou falsa-melissa, é utilizada como exemplo. Alguns usos populares, constituintes fitoquímicos, atividades farmacológicas e estudos agrônômicos da planta são apresentados.

Palavras-Chave: *Lippia alba*, biodiversidade, fitomedicamentos, fitoterápicos.

SUMMARY

The article approaches the pharmaceutical potentiality of Brazilian native plants for the development of medicines and pharmaceutical raw materials. Aspects related to biodiversity, to the acceptability of the use of medicinal plants, to the economic market, to the process of development of phytomedicines or isolated drugs, moreover some topics on the involved legislation are boarded. To show this potential, *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae), a native medicinal species known popularly as false-melissa, is used as example. It is also presented some popular uses, phytochemical compounds, pharmacological activities, and agronomic studies of the plants.

Key-words: *Lippia alba*, biodiversity, phytomedicines, phytopharmaceuticals.

INTRODUÇÃO

Temas como biodiversidade, plantas medicinais e desenvolvimento de novos medicamentos são amplamente discutidos nos meios de comunicação, em virtude de sua relevância e do seu caráter estratégico, especialmente em países considerados emergentes, como o Brasil. A potencialidade das plantas nativas para o desenvolvimento de fármacos e matérias-primas farmacêuticas, fundamenta-se no tripé biodiversidade, aceitabilidade e mercado econômico¹.

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000. Em contrapartida, apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais foram

avaliadas em suas propriedades medicinais².

Nos últimos anos, a procura por drogas vegetais como recurso terapêutico têm aumentado. Entre os fatores que motivam esse aumento estão a insatisfação com os resultados obtidos em tratamentos com a medicina convencional, os efeitos indesejáveis e prejuízos causados pelo uso abusivo e/ou incorreto dos medicamentos sintéticos, a falta de acesso aos medicamentos e à medicina institucionalizada, a consciência ecológica e a crença popular de que o natural é inofensivo³.

Segundo Funari e Ferro⁴ a distribuição mundial do mercado de fitoterápicos em 2001 foi de 3,9 bilhões de dólares na América do Norte, US\$ 6,9 bilhões na Europa, US\$ 5,1 bilhões na Ásia, US\$ 2,3 bilhões no Japão, US\$ 600 milhões na América do Sul e US\$ 800 milhões nos demais países e regiões, totalizando US\$ 19,6 bilhões.

Trabalho realizado no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia Industrial da Universidade Federal de Santa Maria-UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

¹Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFSM, Santa Maria, RS.

²Departamento de Farmácia Industrial, UFSM, Santa Maria, RS.

O desenvolvimento de fitoterápicos inclui várias etapas e envolve um processo interdisciplinar, multidisciplinar e muitas vezes interinstitucional. As áreas de conhecimento envolvidas vão desde a antropologia, botânica, ecologia, química, fitoquímica, farmacologia, toxicologia, biotecnologia, química orgânica até a tecnologia farmacêutica⁵.

Dentre as formas de uso das plantas como fonte terapêutica incluem-se os chás, os extratos brutos ou suas frações padronizadas em preparações farmacêuticas e os compostos isolados, usados diretamente como drogas ou precursores em processos de síntese⁶. Independente do uso considerado, fatores como qualidade, segurança e eficácia são requisitos indispensáveis.

A etapa inicial do processo de desenvolvimento de um fitomedicamento ocorre com a seleção da planta. A seleção pode ser feita com auxílio de pesquisa na literatura científica, da etnobotânica ou etnofarmacologia, da quimiotaxonomia, da toxicidade observada, além de estudos farmacológicos prévios. O passo seguinte diz respeito à coleta, identificação botânica e preparo de material testemunha, bem como estabilização e extração dos constituintes da planta. A partir dos extratos, empregando-se métodos cromatográficos, podem ser obtidos compostos isolados. Nessa fase, são realizados testes de atividade biológica e de toxicidade, e ainda a determinação da estrutura química dos compostos ativos isolados, utilizando-se métodos espectroscópicos. A identificação da estrutura do composto permitirá, dessa forma, estudos subseqüentes da síntese total ou parcial do constituinte ativo, preparação de derivados e/ou análogos, modulação da atividade biológica e definição da relação estrutura-atividade. Produção em larga escala de matéria-prima ativa, aspectos relacionados à tecnologia farmacêutica e testes clínicos completam o ciclo de desenvolvimento de fitomedicamentos⁶.

A legislação vigente, RDC nº 48 / 2004, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, define esta classe como aquela obtida exclusivamente de matérias-primas vegetais com finalidades profiláticas, curativas, paliativas ou para fins de diagnóstico, sendo caracterizada, sobretudo, por apresentar eficácia e segurança comprovadas, bem como reprodutibilidade e constância de qualidade⁷. Não considera medicamento fitoterápico, entretanto, aquele que inclui substâncias ativas isoladas, que recebem a denominação de fitofármacos³. Também não são considerados fitoterápicos as associações de fitofármacos com extratos vegetais. Para fins de registro, a resolução exige dados sobre identificação botânica, autenticidade, pureza, integridade, análise das substâncias ativas, forma de exploração dos recursos naturais, controle em processo e métodos utilizados, testes de estabilidade, farmacologia e toxicologia pré-clínica e clínica, entre outros requisitos⁷.

LIPPIA ALBA (MILL.) N. E. BROWN

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) é uma planta

medicinal nativa da América do Sul, conhecida popularmente como erva-cidreira-de-arbusto, do-campo ou brasileira, alecrim-do-campo ou selvagem, cidreira-brava, falsa-melissa, cidró, cidrão, entre outros⁸.

Preparados a base de *L. alba* são utilizados na medicina popular para o tratamento de diversos males; entre eles encontram-se distúrbios estomacais como cólicas, indigestão, dores, náuseas e espasmos^{9,10,11,12}. Esta espécie também é utilizada nos casos de tosse^{9,10,13}, resfriado^{9,10}, como tranqüilizante ou calmante^{11,12}, no combate à hipertensão^{9,12}, além de sedativo⁹, analgésico¹¹, bem como nos casos de distúrbios hepáticos, gripe, bronquite, sífilis, diarreia, disenteria, como carminativo¹⁰, no tratamento de dores de cabeça¹⁴ e malária¹⁵.

Quanto ao órgão da planta utilizado e o modo de preparo, destacam-se as folhas^{9,11,13} e raízes⁹ sob forma de infusão^{12,16}, decocção^{13,16}, maceração, em compressas, banhos ou extratos alcoólicos¹⁷.

Dentre os metabólitos secundários descritos para *L. alba*, é relatada a presença de óleos essenciais, flavonóides sulfatados na posição 4, taninos, geniposídeos (iridóides), saponinas triterpênicas, resinas e mucilagens¹⁸.

Como principais constituintes dos óleos voláteis de *L. alba*, Pascual et al.¹⁸ citam os monoterpenóides (borneol, cânfora, 1,8-cineol, citronelol, geranial, linalol, mirceno, neral, piperetona, sabineno, 2-undecanona) e os sesquiterpenóides (a-muuroloeno, b-cariofileno, b-cubebeno, b-elemeneno, g-cadineno, alo-aromadendreno, óxido de cariofileno).

As atividades farmacológicas descritas na literatura fornecem indícios que podem explicar, pelo menos em parte, alguns dos usos terapêuticos de *L. alba* na medicina popular.

Pascual et al.¹⁶ demonstraram a atividade antiulcerogênica em ratos Wistar tratados por via oral com a infusão das folhas de *L. alba* na dose de 12,5 g da planta seca / Kg. A infusão foi efetiva na prevenção da ulceração induzida pela indometacina e, na dose testada, não causou lesão gástrica, nem modificou o pH gástrico e a acidez total.

O percolato etanólico das folhas de *L. alba* a 80% (v/v), administrado por via oral (dose única de 200 mg de resíduo seco / Kg) a ratos Swiss, apresentou ação sedativa e miorelaxante. A correlação entre o conteúdo total de flavonóides e o efeito sedativo, de acordo com Zétola et al.¹⁹, indica que, provavelmente, estes compostos contribuam para a ação sedativa.

Em outro estudo, os óleos essenciais de três quimiotipos de *L. alba*, I (cital, b-mirceno e limoneno), II (cital e limoneno) e III (carvona e limoneno), emulsionados e administrados a ratos Swiss pela via intraperitoneal, apresentaram efeito ansiolítico, sedativo, hipotérmico e, adicionalmente, miorelaxante para o quimiotipo II, em testes de avaliação comportamental¹¹.

Em testes com as substâncias citral, mirceno e limoneno foi demonstrado seu efeito sedativo e miorelaxante, além da potenciação do pentobarbital em roedores. Estas substâncias, no entanto, não apresentaram ação ansiolítica, indicando que esta atividade deve ser de responsabilidade de outros componentes do óleo essencial da planta²⁰.

O efeito sedativo, miorelaxante e ansiolítico, descritos anteriormente, são similares àqueles obtidos pela ação dos benzodiazepínicos no receptor GABA, o que sugere que tanto os componentes dos óleos como das frações não voláteis atuam nesses receptores^{11,19}.

Quanto à atividade antioxidante *in vitro* pelo método da oxidação do ácido linoléico em compostos carbonílicos, o óleo essencial de *L. alba* obtido por hidrodestilação exibiu efeito similar à vitamina E e ao 2-(*ter*-butil)-4-metoxifenol (BHA) nas concentrações de 5 – 20,0 g/L²¹. Da mesma forma, o percolato hidroalcoólico demonstrou bom potencial capturador de radicais livres, de acordo com os parâmetros testados: redução da 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) (IC₅₀ < 30 µg/mL) e inibição da peroxidação lipídica *in vitro* (IC₅₀ < 32 µg/mL). Através do teste da capacidade antimutagênica via atividade antioxidante, utilizando-se o método de reversão do dano oxidativo induzido por *ter*-butil-hidroperóxido (TBH) em *Escherichia coli*, foi comprovada a toxicidade desse extrato frente à espécie testada, nas concentrações de 2,5 a 10 mg/placa²².

Nos ensaios microbiológicos com *Neurospora crassa*, foi detectada atividade antifúngica para o extrato aquoso das folhas (64,8% de inibição) e para o extrato alcoólico das folhas e talos desta espécie (64,3 e 85,7% de inibição, respectivamente)²³.

A atividade citotóxica de extratos brutos *L. alba* também foi alvo de pesquisa. O extrato etanólico da folha mostrou maior citotoxicidade frente às células HEp-2, derivadas de carcinoma epidermóide de laringe, com CI₅₀ = 8,17 µg/mL. Para as células NCI-H292, obtidas de carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano, foi observada maior citotoxicidade do extrato clorofórmico da raiz, com CI₅₀ = 4,64 µg/mL²⁴.

Gazola et al.¹² demonstraram que o extrato aquoso de *L. alba* provoca redução da frequência cardíaca no teste de coração isolado de rato. A força contrátil, entretanto, não é alterada. O screening fitoquímico desse extrato revelou a presença de taninos, alcalóides e flavonóides. Uma possível explicação para o efeito observado, segundo os autores, poderia ser a estimulação de receptores muscarínicos ou o bloqueio de canais de cálcio que induzem bradicardia.

Em relação à atividade antimicrobiana, o óleo essencial de *L. alba* causou inibição moderada no crescimento de *Candida albicans* (CIM = 0,6 mg/L). No entanto, o extrato etanólico mostrou-se inativo. A análise química dos componentes do óleo evidenciou o linalol (76,30%) como componente majoritário¹⁴. Em contrapartida, os extratos hidroalcoólicos obtidos por maceração apresentaram atividade antimicrobiana moderada contra *C. krusei*

(125 µg/mL) e fraca contra *C. parapsilosis* (1000 µg/mL), utilizando-se o método de microdiluição em caldo²⁵. No caso da atividade antibacteriana, os extratos aquoso e metanólico apresentaram baixas porcentagens de inibição do crescimento bacteriano, na concentração de 8 mg/mL, contra alguns dos microrganismos testados (*Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* e *Salmonella* sp.) No entanto, esta porcentagem de inibição foi maior do que aquela demonstrada pelo cloranfenicol²⁶.

Para a fração butanólica e acetato de etila, provenientes da extração líquido-líquido do macerado etanólico de *L. alba*, foi detectada atividade antiviral, contra o vírus Herpes simples tipo 1 resistente ao aciclovir e contra o vírus da pólio tipo 2, respectivamente. O screening fitoquímico realizado com o macerado etanólico detectou a presença de compostos fenólicos e flavonóides²⁷.

Além das atividades descritas anteriormente, Pascual et al.¹⁸ incluem as atividades analgésica, antiinflamatória e antipirética para a espécie *L. alba*.

Para a produção de um fitoterápico a partir de *L. alba* faz-se necessária a produção de matéria-prima em larga escala. Para tanto, são essenciais estudos agrônomicos, que visem obter a melhor relação custo-benefício, considerando-se a produtividade e a qualidade da planta. Alguns estudos visando a otimização do cultivo desta espécie medicinal foram descritos na literatura.

Atti-Serafini et al.²⁸ investigaram a variação da composição dos óleos essenciais de *L. alba* nos diferentes meses do ano. O rendimento médio de óleo essencial extraído foi de 0,23%, sendo o linalol (50,0% - 79,2%) e o 1,8-cineol (7,3% - 14,1%), os componentes majoritários. Nos meses de dezembro a março, a planta apresentou o maior teor de linalol e o maior rendimento de óleo essencial.

Em outro trabalho semelhante, foi investigada a composição dos óleos essenciais das folhas de *L. alba* em diferentes épocas de coleta e partes do ramo (apical, mediana e basal). Independente das variáveis estudadas, neral e geranial foram os constituintes majoritários, enquanto que a carvona somente foi encontrada no verão e na primavera, nas regiões apical e basal, respectivamente²⁹.

Nagao et al.³⁰ pesquisaram o efeito do horário da coleta sobre o teor e constituintes majoritários do óleo essencial de *L. alba*, quimiotipo citral-limoneno. No mês de agosto, considerada a estação seca, o teor de óleo essencial foi maior que na estação chuvosa, correspondendo ao mês de maio, sendo o melhor horário de coleta às 15 horas nas duas estações. O horário de coleta que propiciou um maior teor relativo de citral foi às 15 horas e limoneno às 11 horas, independente de cada estação.

Para o quimiotipo de *L. alba* limoneno-carvona, Santos e Innecco³¹ avaliaram os efeitos da adubação orgânica e das

alturas de corte na produção da matéria seca foliar e do óleo essencial. Os resultados deste estudo indicaram que a adubação não influencia significativamente a produção da biomassa foliar e do óleo essencial. Além disso, a produção de limoneno não foi afetada, embora a produção de carvona tenha sido influenciada negativamente. Os cortes a 45 cm de altura resultaram em maior produção de matéria seca foliar, enquanto que as maiores concentrações de óleo essencial foram obtidas nos cortes a 30 e 45 cm de altura. As maiores produções de limoneno foram obtidas com corte à altura de 30 cm e as de carvona com corte à altura de 15 cm.

A ação de fitoreguladores (GA_3 , etefon e CCC) sobre o crescimento de *L. alba* em diferentes épocas do ano mostrou que GA_3 e CCC tendem a aumentar as quantidades de matéria seca de caule, folhas, flores e matéria seca total³².

Biasi e Costa⁸ realizaram um estudo sobre a propagação vegetativa de *L. alba*, e detectaram que as estacas medianas com quatro folhas apresentaram o maior desenvolvimento radical. Gupta et al.³³, por sua vez, realizaram estudos de micropropagação *in vitro* de *L. alba*, e demonstraram que o perfil do óleo essencial e a morfologia das plantas micropropagadas são idênticas às plantas propagadas vegetativamente.

DISCUSSÃO

Apesar de possuir a maior diversidade vegetal do mundo, o Brasil conhece muito pouco acerca da flora nativa e, em especial, das propriedades medicinais que essas plantas possam apresentar. Medidas de preservação e conservação dessa biodiversidade são necessidades iminentes diante desse fato, uma vez que a exploração de plantas nativas de uso medicinal, através da extração direta nos ecossistemas (extrativismo), tem levado a reduções drásticas das populações naturais dessas espécies. O uso dos recursos naturais de maneira sustentável, bem como a domesticação e o cultivo, quando possíveis, aparecem como opções para obtenção de matéria-prima de interesse farmacêutico e redução do extrativismo nas formações florestais. A produção de fitomedicamentos a partir de plantas cultivadas torna-se ainda mais atrativo tendo em vista a produção de biomassa associada à produção do(s) princípio(s) ativo(s) de interesse².

O aumento da procura por drogas vegetais reflete os índices de crescimento do setor. Sobre este aspecto, no Brasil, o crescimento do mercado de medicamentos fitoterápicos é da ordem de 15% ao ano, enquanto o crescimento anual do mercado de medicamentos sintéticos gira em torno de 3 a 4%². Este crescimento, que também é observado em outros países, pode gerar divisas para o Brasil desde que a produção de fitomedicamentos atenda os quesitos de qualidade, eficácia e segurança.

Estrategicamente, políticas claras que proporcionem ações e fomento do governo na área de fitoterápicos são entraves antigos;

porém são necessárias, não só para o desenvolvimento do setor, como também para o desenvolvimento social e econômico do país. Recentemente o Ministério da Saúde publicou portaria que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), objetivando a implementação de ações e serviços relativos a práticas medicinais alternativas, entre elas a fitoterapia³⁴. O decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, fortalece e amplia as ações políticas voltadas ao setor, constituindo-se num marco regulatório histórico. Como objetivo geral, esta política visa garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional³⁵. Além de ampliar o acesso à saúde, entre outros fatores, o impacto esperado com essas medidas é a diminuição da dependência externa e o aumento da competitividade do setor farmacêutico nacional.

Em âmbito prático, é imprescindível o trabalho conjunto entre os diferentes ramos do conhecimento e setores da sociedade para o desenvolvimento de novos medicamentos. Simões e Schenkel¹, por exemplo, enfatizaram a necessidade da interação entre a indústria com a academia, enquanto Maciel et al.³⁶ ressaltaram a importância dos estudos multidisciplinares com plantas medicinais, envolvendo a etnobotânica, a química e a farmacologia. Segundo os últimos autores, a integração entre as diferentes áreas na pesquisa de plantas medicinais conduz a um caminho promissor e eficaz para a descoberta de novos medicamentos.

Uma das espécies medicinais nativas promissoras ao desenvolvimento de um novo medicamento é sem dúvida *Lippia alba*. Esta espécie apresenta uma série de estudos pré-clínicos evidenciando várias das atividades relacionadas ao seu uso popular. No entanto, apesar do futuro promissor, a exemplo de outras espécies nativas, *Lippia alba* necessita de um maior número de estudos para poder gerar um fitomedicamento ou fitoterápico cientificamente validado.

Uma vez que trabalhos anteriores comprovaram a correlação existente entre a variabilidade na constituição química e o período vegetativo da planta, cabe determinar que influência esta variabilidade exerce sobre as diferentes atividades farmacológicas. Assim poderá ser determinada a melhor época de coleta para *L. alba*, com o objetivo de potencializar determinada atividade, e desta forma aumentar a eficácia de um fitoterápico preparado a partir desta espécie vegetal. Também é necessário o desenvolvimento de formas fitofarmacêuticas adequadas, de ensaios clínicos e de metodologia de controle de qualidade da matéria prima e dos produtos acabados com o objetivo de garantir eficácia, segurança e qualidade.

Neste ponto, cabe ressaltar a importância da proteção dos novos medicamentos gerados através do registro de patentes. Conforme a lei de propriedade industrial, não são passíveis de serem patenteáveis o todo ou parte de seres vivos naturais e materiais biológicos encontrados na natureza, ainda que dela isolados, uma vez que não são consideradas invenções³⁷. Por esse motivo, em relação às espécies vegetais, são cabíveis de patentes apenas os processos para obtenção de extratos ou substâncias ativas isoladas, bem como as composições farmacêuticas e seus processos de preparo, além dos usos dos produtos obtidos. Um levantamento envolvendo 278 plantas nativas brasileiras revela que 66,9% são sujeitas à aplicação ou à concessão de patentes. De 738 documentos de patentes analisados, apenas 5,8% foram aplicações brasileiras³⁸. Diante disso, faz-se necessário maior uso do sistema de patentes com a finalidade de proteger os resultados de pesquisa e de garantir o retorno dos investimentos gastos³⁸, para evitar que o Brasil continue sendo comprador de tecnologias importadas ou pagador de *royalties* para laboratórios farmacêuticos estrangeiros⁴.

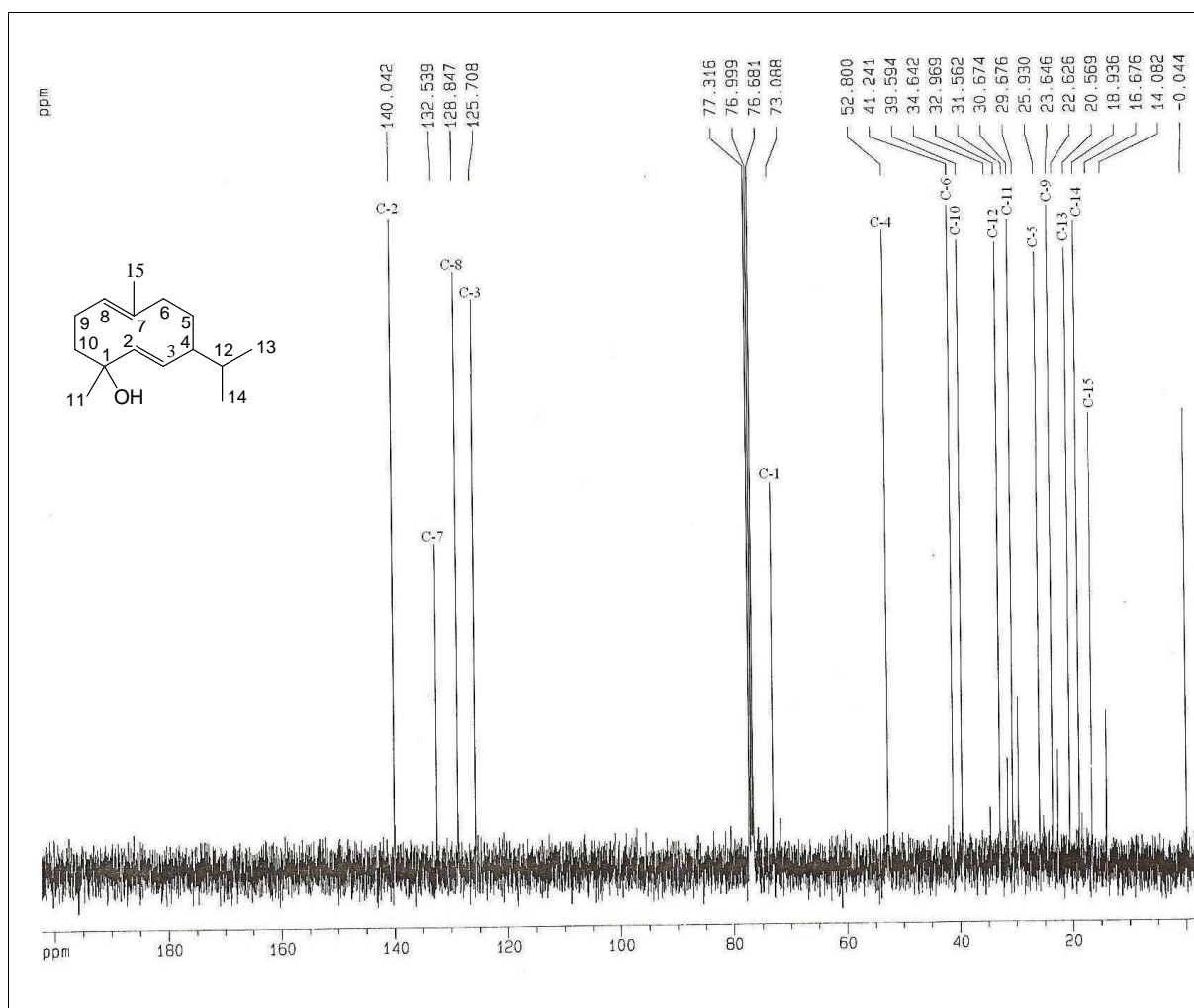
REFERÊNCIAS

1. Simões CMO, Schenkel EP. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2002; 12(1): 35-40.
2. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2003.
3. Rates SMK. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino da farmacognosia. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2001; 11(2): 57-69.
4. Funari CS, Ferro VO. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2005; 15(2): 178-82.
5. Toledo ACO, Hirata LL, Buffon MCM, Miguel MD, Miguel OG. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. *Revista Lecta* 2003; 21(1/2): 7-13.
6. Rates SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon* 2001; 39: 603-13.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.
8. Biasi LA, Costa G. Propagação vegetativa de *Lippia alba*. *Ciência Rural*, Santa Maria 2003; 33: 455-9.
9. Stasi LC, Oliveira GP, Carvalhaes MA, Queiroz-Junior M, Tien OS, Kakinami SH, et al. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia* 2002; 73: 69-91.
10. Braga MEM, Ehlert AD, Ming LC, Meireles MAA. Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract composition. *The Journal of Supercritical Fluids* 2005; 34: 149-56.
11. Vale TG, Matos FJA, Lima TCM, Viana GSB. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. *J. Ethnopharmacol.* 1999; 167: 127-33.
12. Gazola R, Machado D, Ruggiero C, Sing G, Alexandre MM. *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats. *Pharmacological Research* 2004; 50: 477-80.
13. Scarpa GF. Medicinal plants used by the criollos of Northwestern Argentine Chaco. *J. Ethnopharmacol.* 2004; 91: 115-35.
14. Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 2005; 97: 305-11.
15. Vigneron M, Deparis X, Deharo E, Boudy G. Antimalarial remedies in French Guiana: A knowledge attitudes and practices study. *J. Ethnopharmacol.* 2005; 98: 351-60.
16. Pascual ME, Slowing K, Carretero ME, Villar Á. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). *Il Farmaco* 2001; 56: 501-4.
17. Julião LS, Tavares ES, Lage CLS, Leitão SG. Cromatografia em camada fina de três extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. (erva-cidreira). *Rev. Bras. Farmacogn.* 2003; 13: 36-8.
18. Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Mata DS, Villar A. *Lippia*: tradicional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J. Ethnopharmacol.* 2001; 76: 201-14.
19. Zétola M, Lima TCM, Sonaglio D, González-Ortega G, Limberger RP, Petrovick PR, et al. CSN activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* – Verbenaceae (Brazilian false *Melissa*) *J. Ethnopharmacol.* 2002; 82: 207-15.
20. Vale TG, Furtado EC, Santos Jr JG, Viana GSB. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown. *Phytomedicine* 2002; 9: 709-14.
21. Stashenko EE, Jaramillo BE, Martínez JR. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evolution of its in vitro antioxidant activity. *J. Chromatogr., A* 2004; 1025: 93-103.
22. Ramos A, Visozo A, Piloto J, García A, Rodríguez CA, Rivero R. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 2003; 87: 241-6.
23. Abraham AML, Hernandez NMR, Misas CAJ. Extractos de plantas con propiedades citostáticas que crecen em Cuba. *Rev Cub Med Trop* 1979; 31: 105-11.
24. Costa MCCD, Aguiar JS, Nascimento SC. Atividade citotóxica de extratos brutos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). *Acta Farm. Bonaerense* 2004; 23(3): 349-52.
25. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian

- folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2002; 97(7): 1027-31.
26. Alanis AD, Calzada F, Cervantes JA, Torres J, Ceballos GM. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. J. Ethnopharmacol. 2005; 100: 153-7.
27. Andregretti-Fröhner CR, Sincero TCM, Silva AC, Savi LA, Gaido CM, Bettega JMR, et al. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. Fitoterapia 2005; 76: 374-8.
28. Atti-Serafini L, Pansera MR, Atti-Santos AC, Rossato M, Pauletti GF, Rota LD, et al. Variation in essential oil yield and composition of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. grown in southern Brazil. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais 2002; 4(2): 72-4.
29. Castro DM, Ming LC, Marques MOM. Composição fitoquímica dos óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br em diferentes épocas de colheita e partes do ramo. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais 2002; 4(2): 75-9.
30. Nagao EO, Innecco R, Mattos SH, Medeiros Filho S, Marco CA. Efeito do horário de colheita sobre o teor e constituintes majoritários de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br., quimiotipo citral-limoneno. Revista Ciência Agronômica 2004; 35(2): 355-60.
31. Santos MRA, Innecco R. Adubação orgânica e altura do corte de erva-cidreira brasileira. Hort. Bras. 2004; 22(2): 182-5.
32. Stefanini MB, Rodrigues SD, Ming LC. Ação de fitorreguladores no crescimento da erva cidreira-brasileira. Hort. Bras. 2002; 20(1): 18-23.
33. Grupta SK, Khanuja SPS, Kumar S. *In vitro* micropropagation of *Lippia alba*. Current Science 2001; 81(2): 206-10.
34. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde.
35. Brasil. Atos do poder executivo. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a política nacional de plantas medicinais e de outras providências.
36. Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr VF. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. Quim. Nova 2002; 25(3): 429-38.
37. Brasil. Lei nº 9.279, de 14 de maio de 1996. Lei da Propriedade Industrial.
38. Moreira AC, Müller ACA, Pereira Jr N, Antunes AMS. Pharmaceutical patents on plant derived materials in Brazil: Policy, law and statistics. World Patent Information 2006; 28: 34-42.

Endereço para correspondência:
Prof Dra. Berta Maria Heinzmann
Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Farmácia Industrial, Prédio 26
Campus Universitário
CEP. 97105-900 - Santa Maria - RS, Brasil
E-mail: hberta@ccs.ufsm.br

8.2 Espectros de RMN do germacreno D-4-ol

Figura 19 – Espectro de RMN ^{13}C do germacreno D-4-ol (100 MHz, CDCl_3).

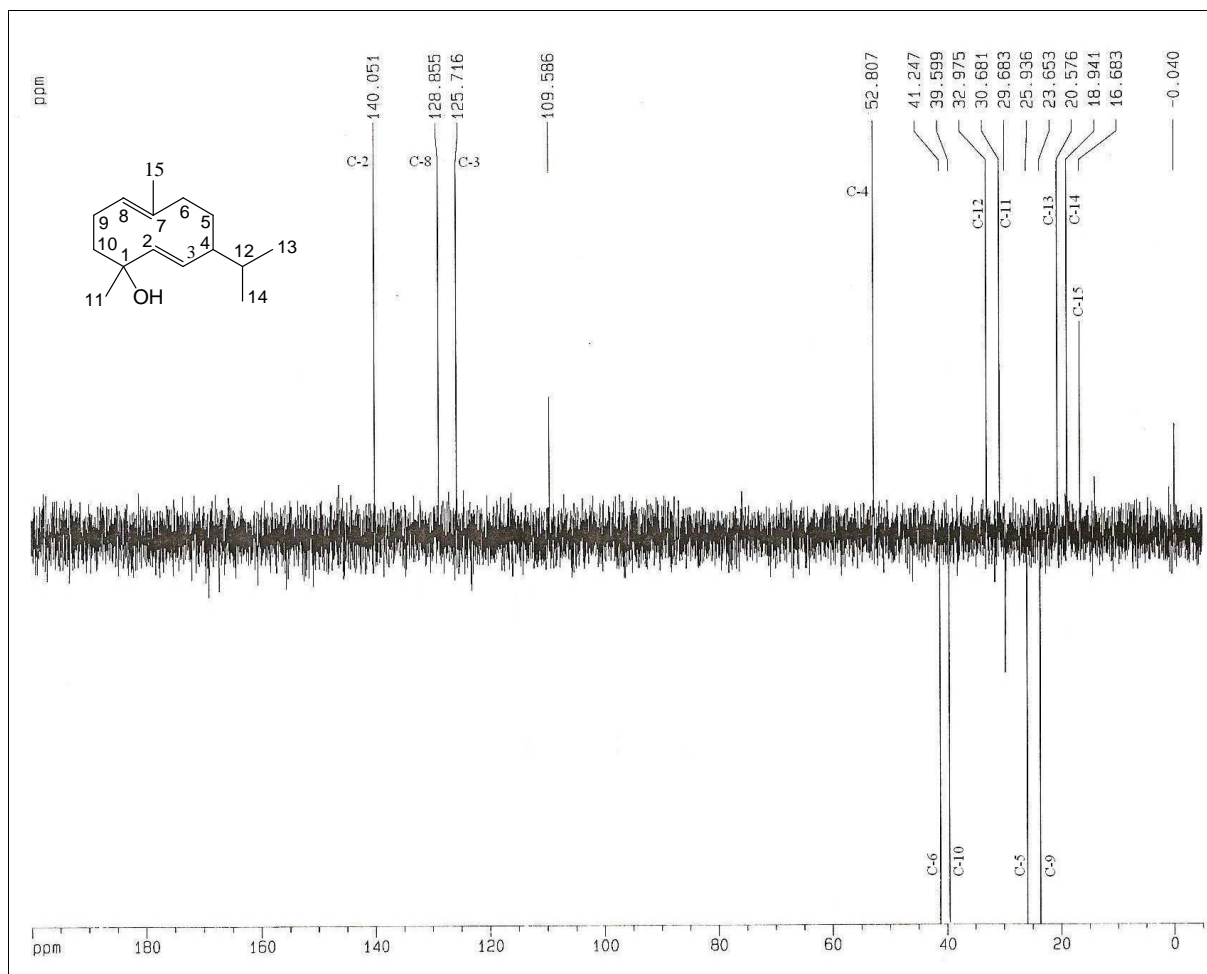


Figura 20 – Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° do germacreno D-4-ol (100 MHz, CDCl_3).

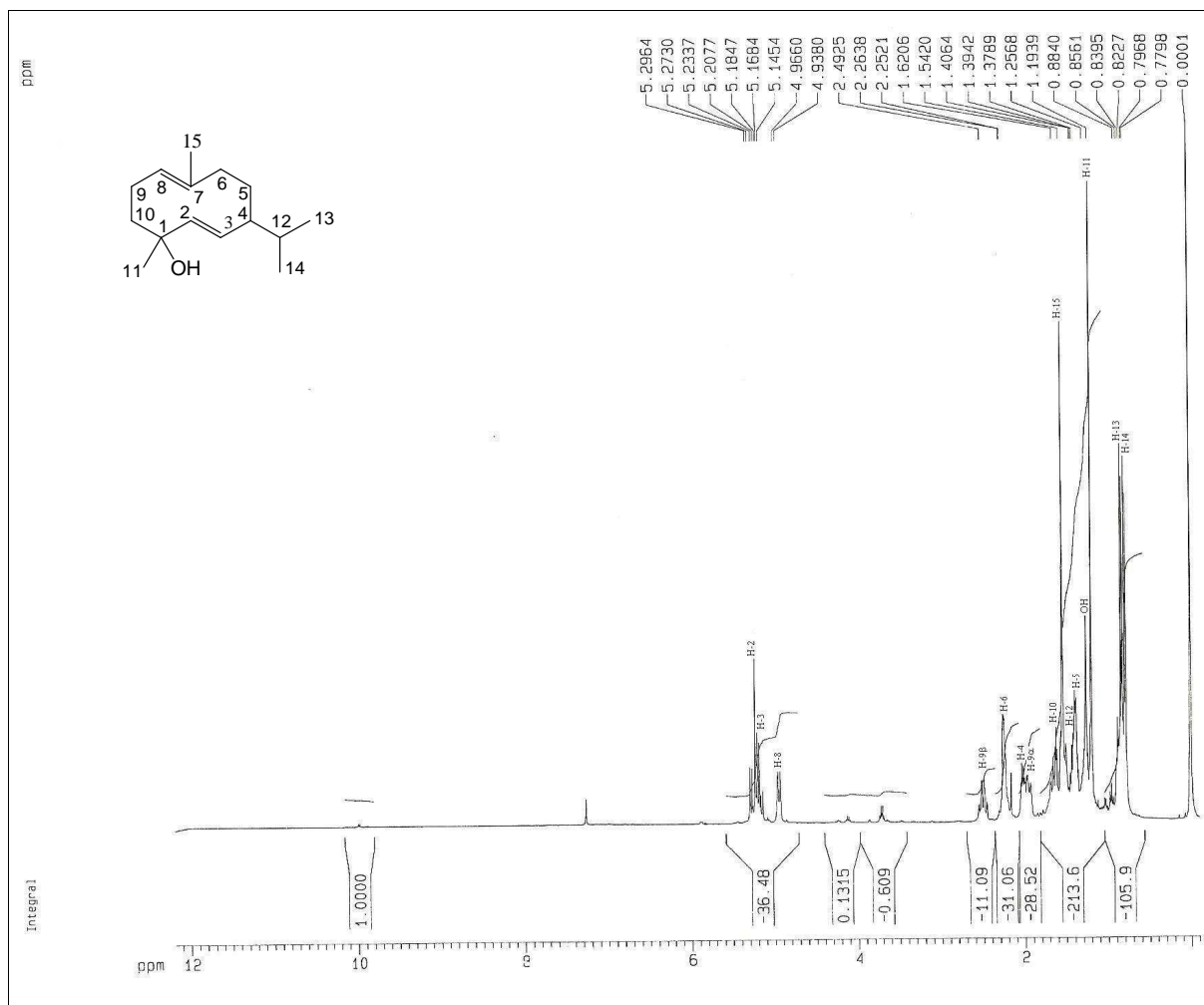


Figura 21 – Espectro de RMN ^1H do germacreno D-4-ol (400 MHz, CDCl_3).

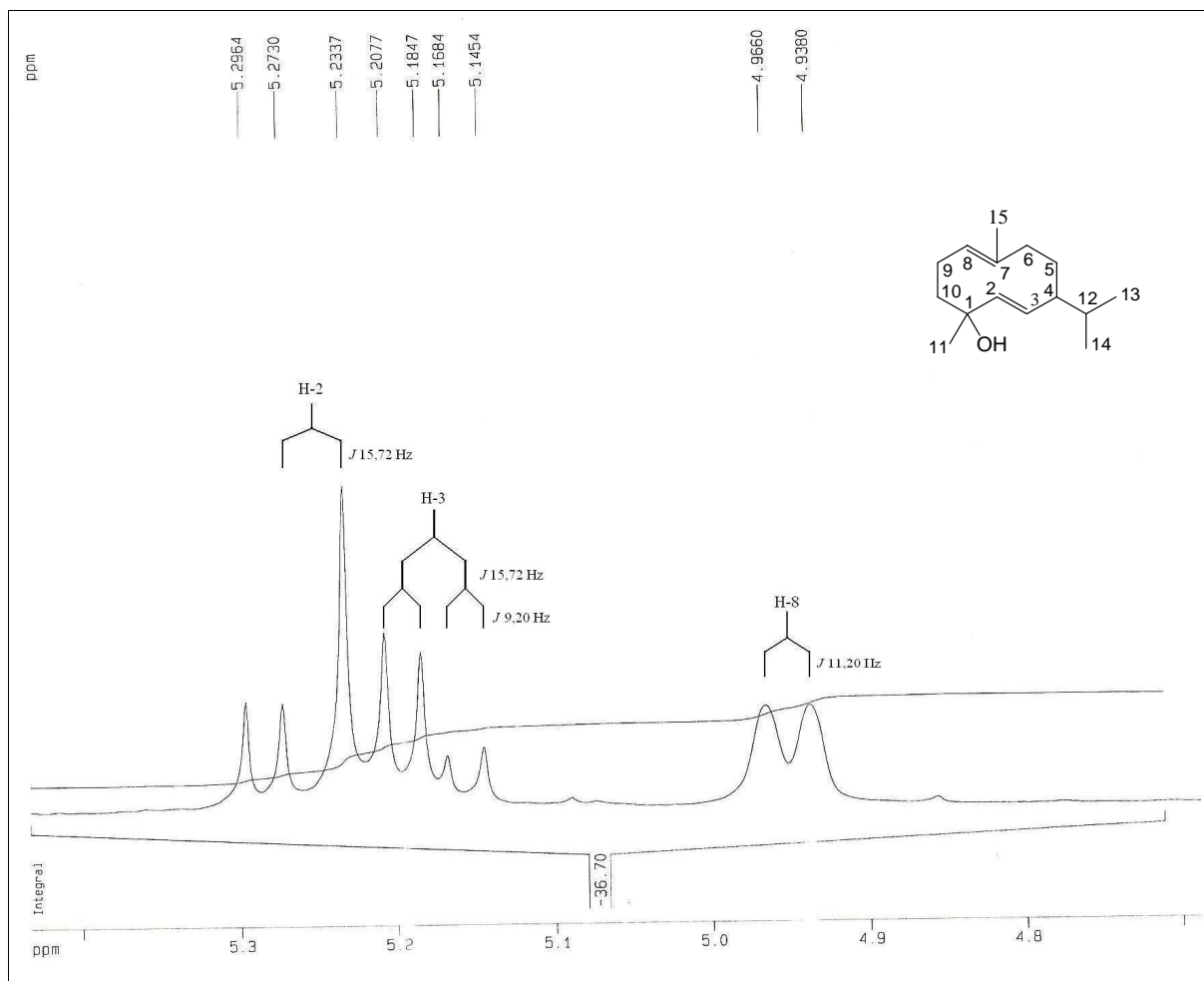


Figura 22 – Ampliações do espectro de RMN ^1H do germacreno D-4-ol na região de δ 4,80 a 5,30 ppm (400 MHz, CDCl_3).

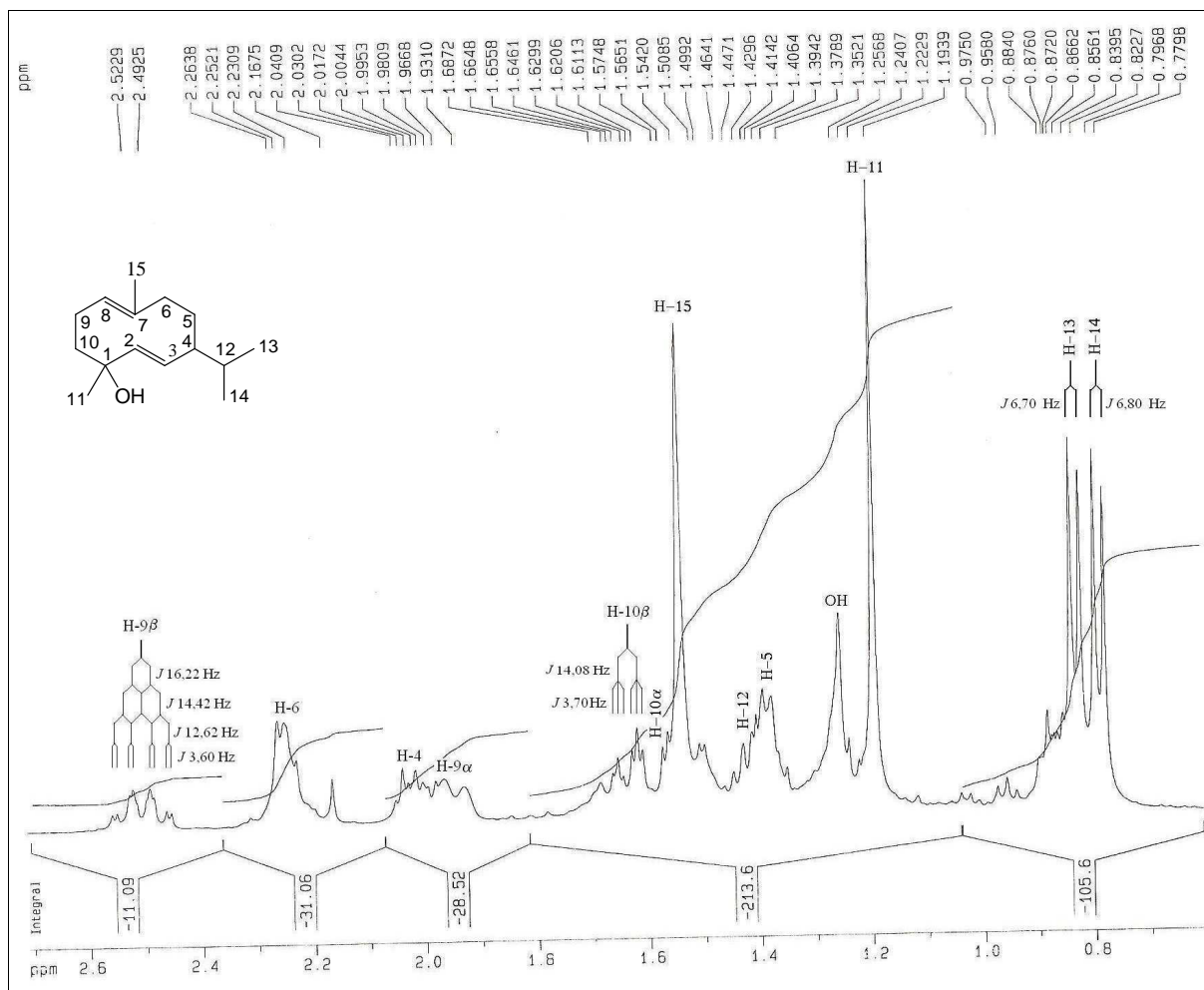


Figura 23 – Ampliações do espectro de RMN ^1H do germacreno D-4-ol na região de δ 0,60 a 2,60 ppm (400 MHz, CDCl_3).

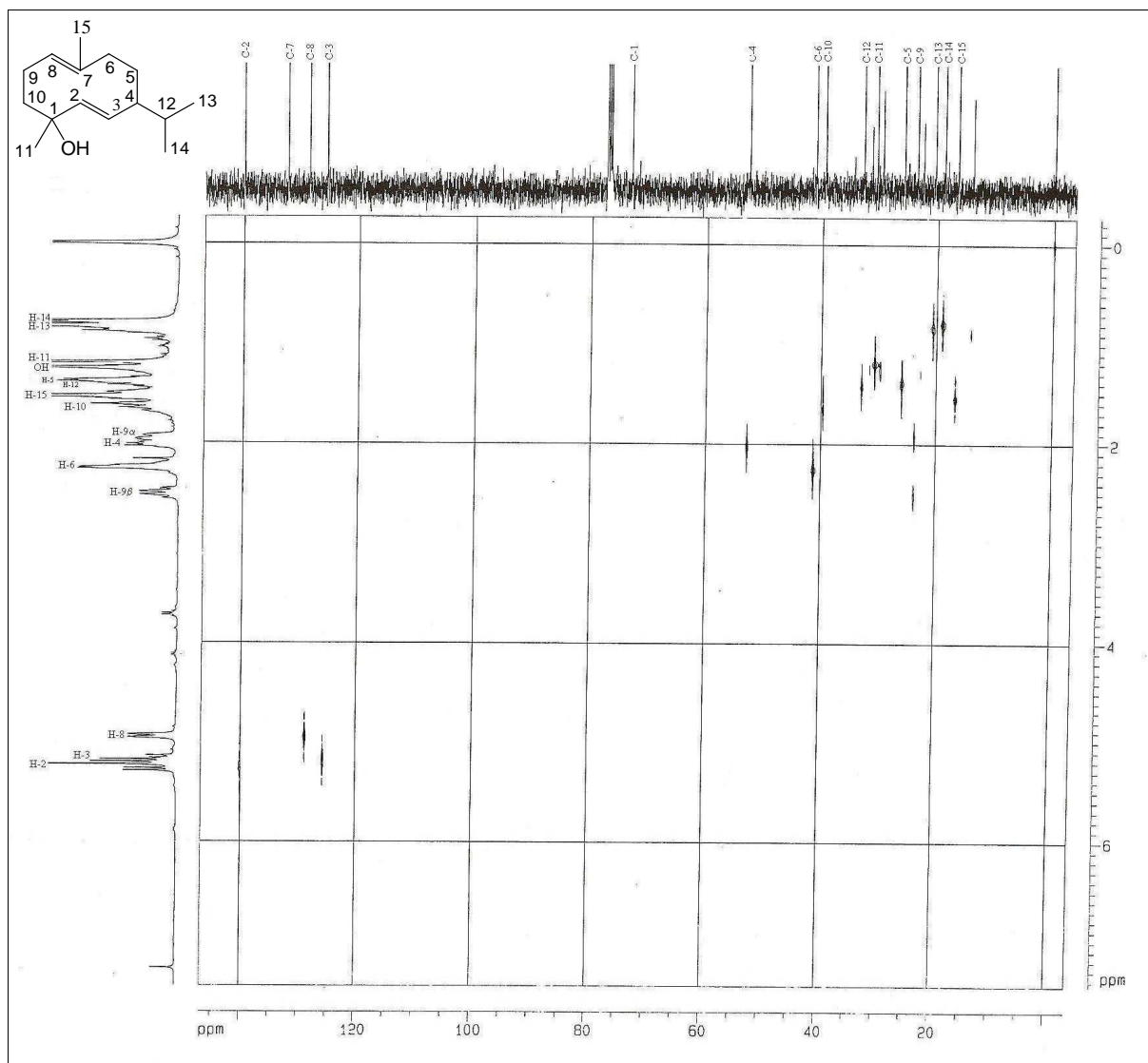


Figura 24 – Espectro de RMN de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C HETCOR) do germacreno D-4-ol (400/100 MHz, CDCl_3).

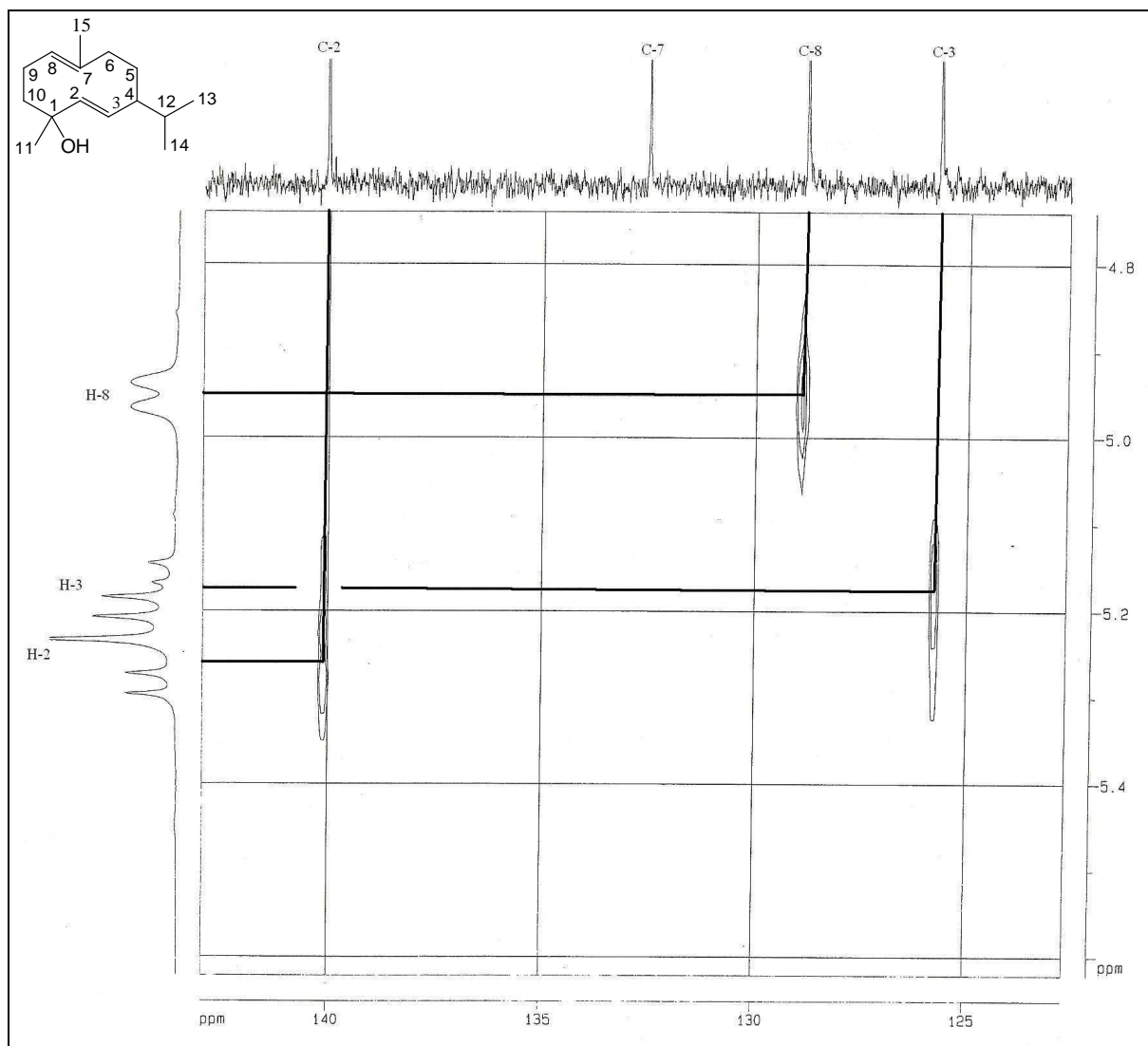


Figura 25 – Espectro expandido (campo baixo) de RMN de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C HETCOR) do germacreno D-4-ol (400/100 MHz, CDCl_3).

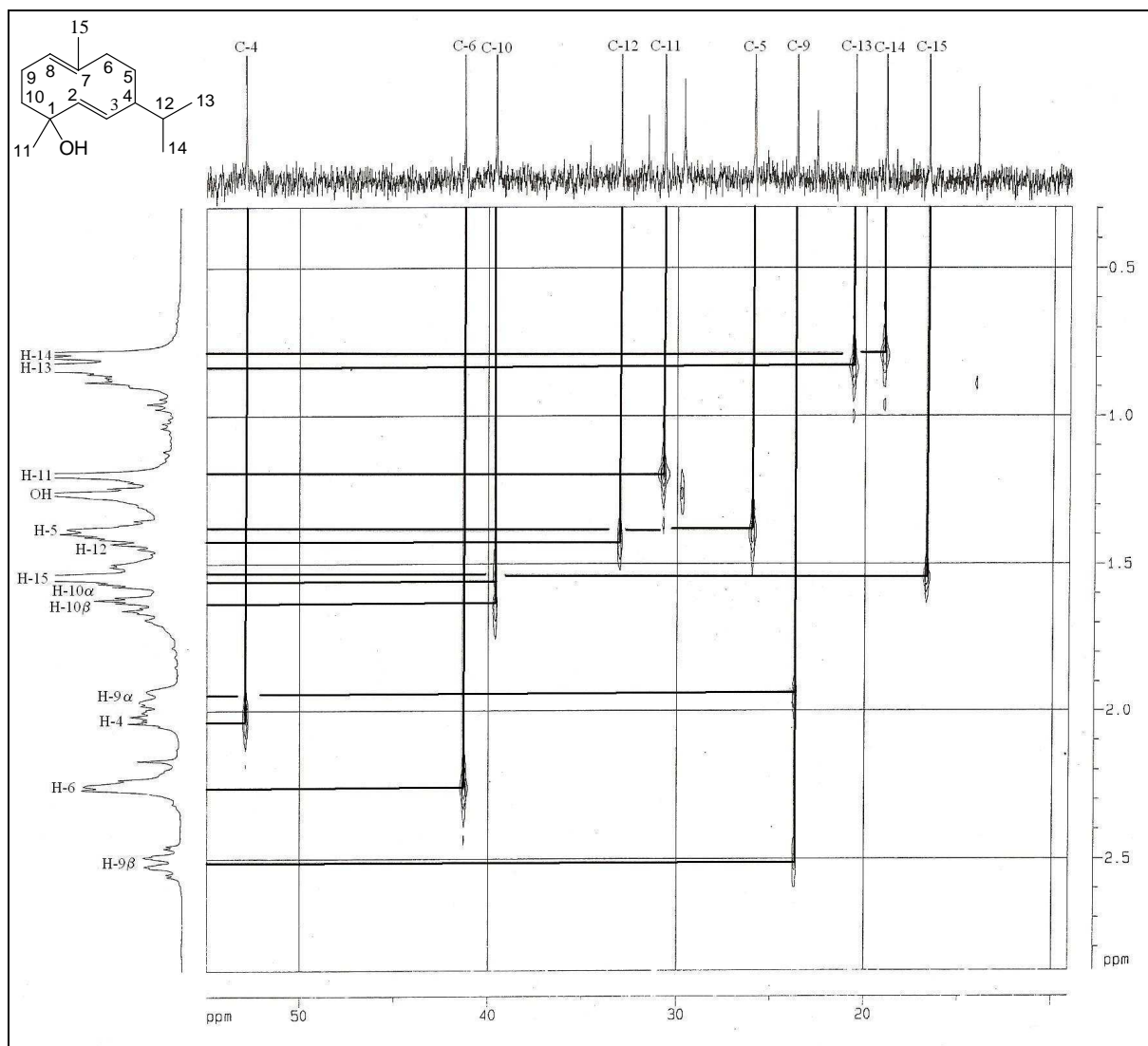


Figura 26 – Espectro expandido (campo alto) de RMN de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C HETCOR) do germacreno D-4-ol (400/100 MHz, CDCl_3).

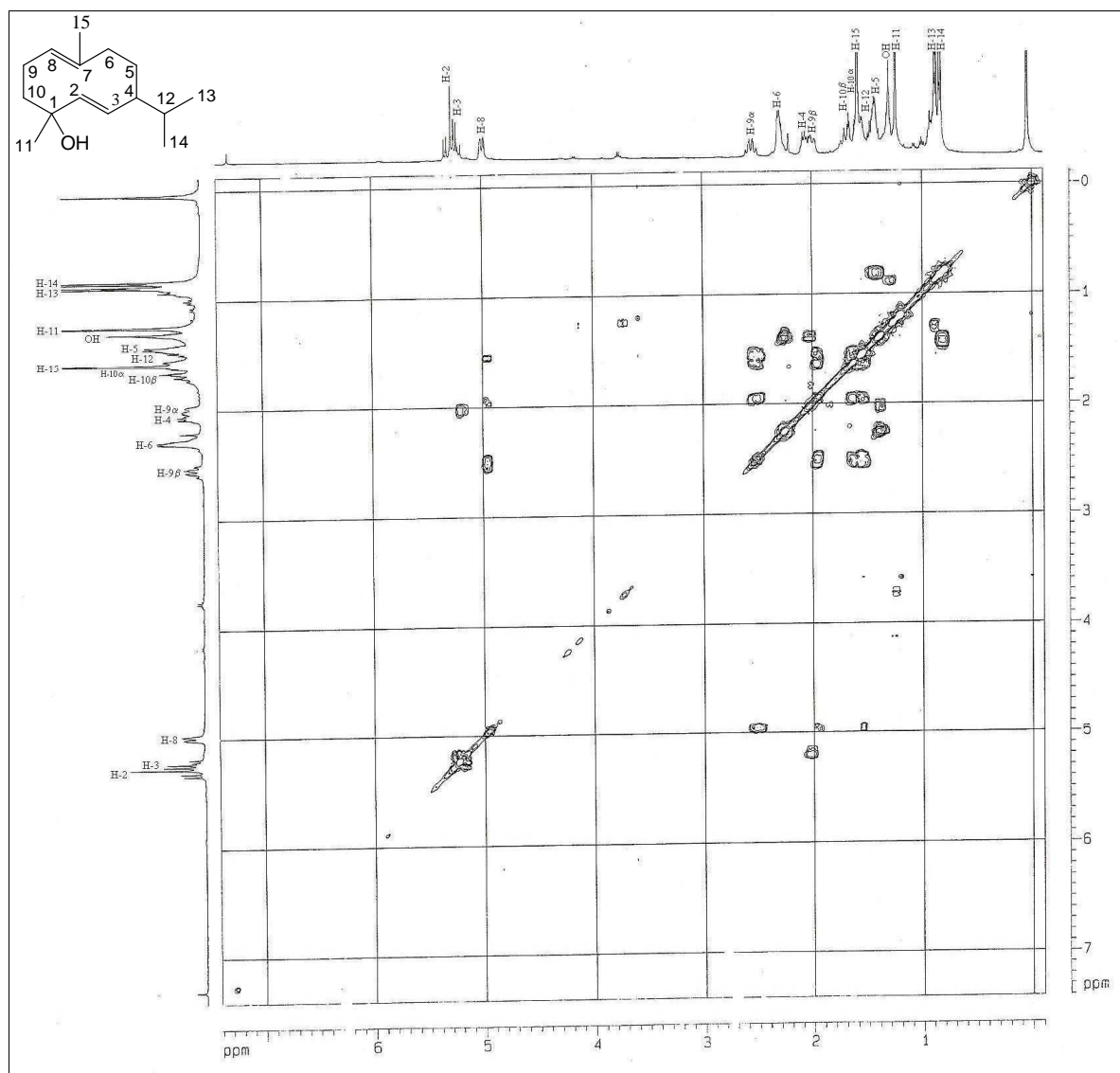


Figura 27 – Espectro de RMN de correlação homonuclear (^1H - ^1H COSY) do germacreno D-4-ol (400 MHz, CDCl_3).

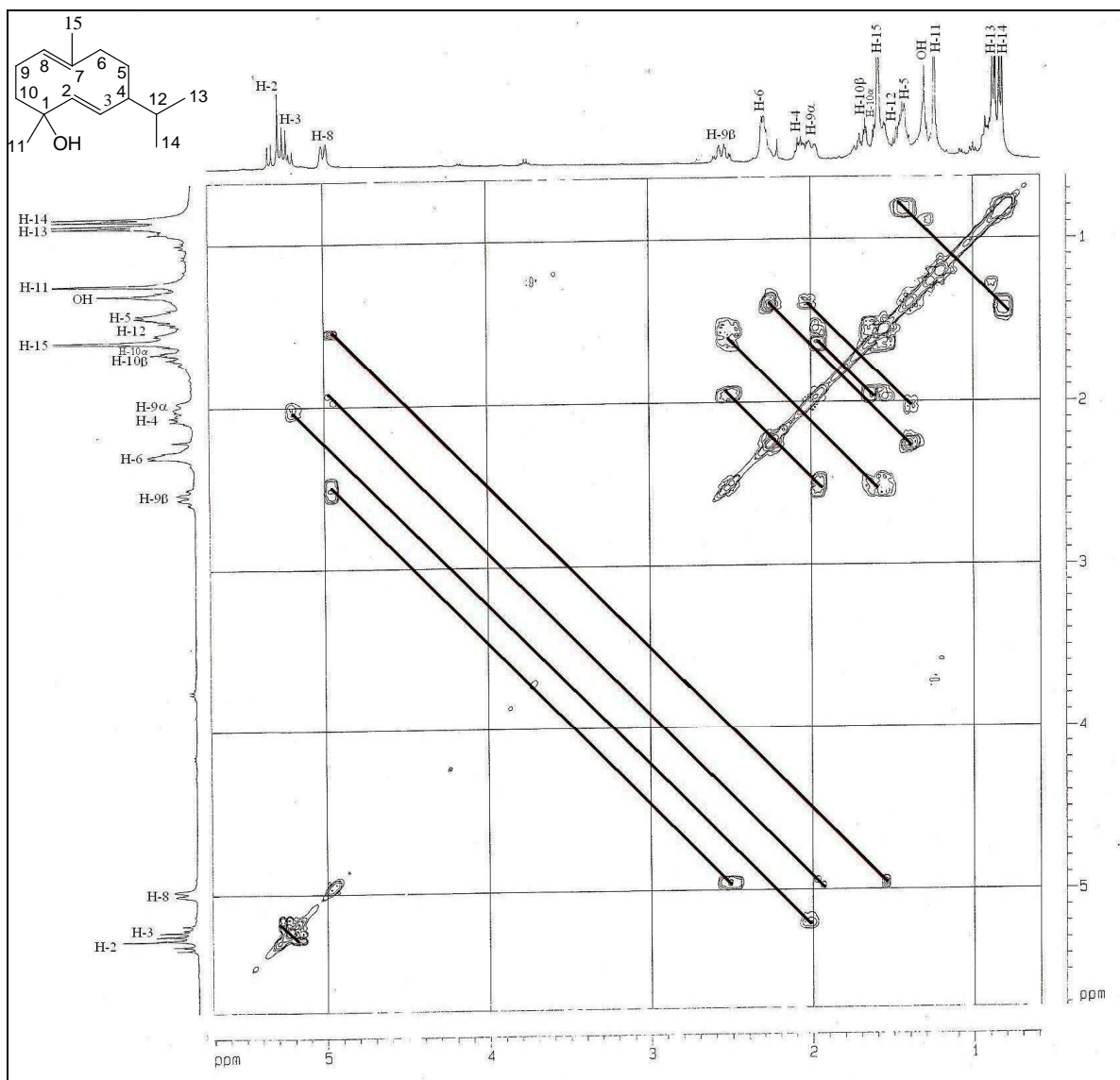
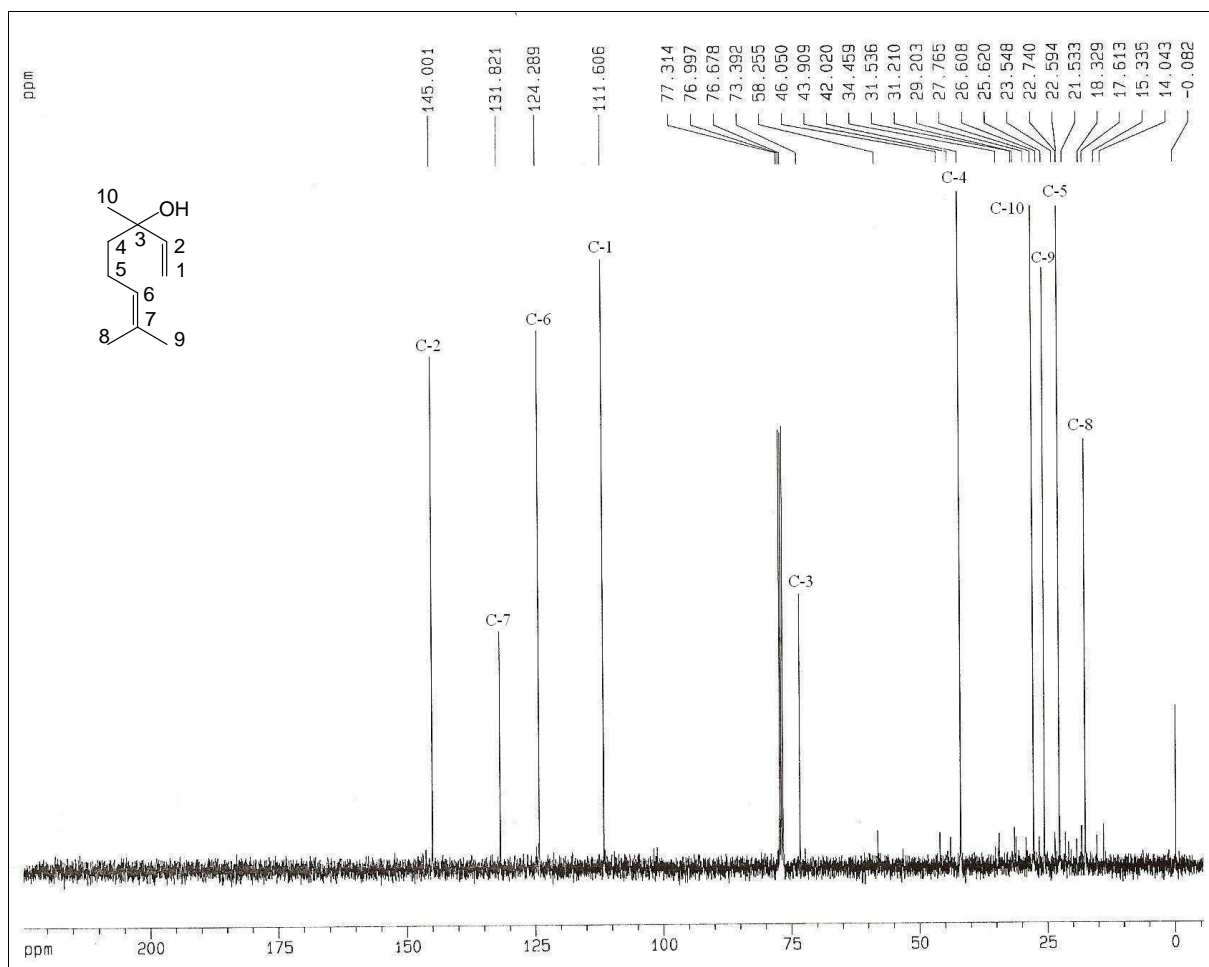


Figura 28 – Espectro expandido de RMN de correlação homonuclear (^1H - ^1H COSY) do germacreno D-4-ol (400 MHz, CDCl_3).

8.3 Espectros de RMN do linalol.

Figura 29 – Espectro de RMN ^{13}C do linalol (100 MHz, CDCl_3).

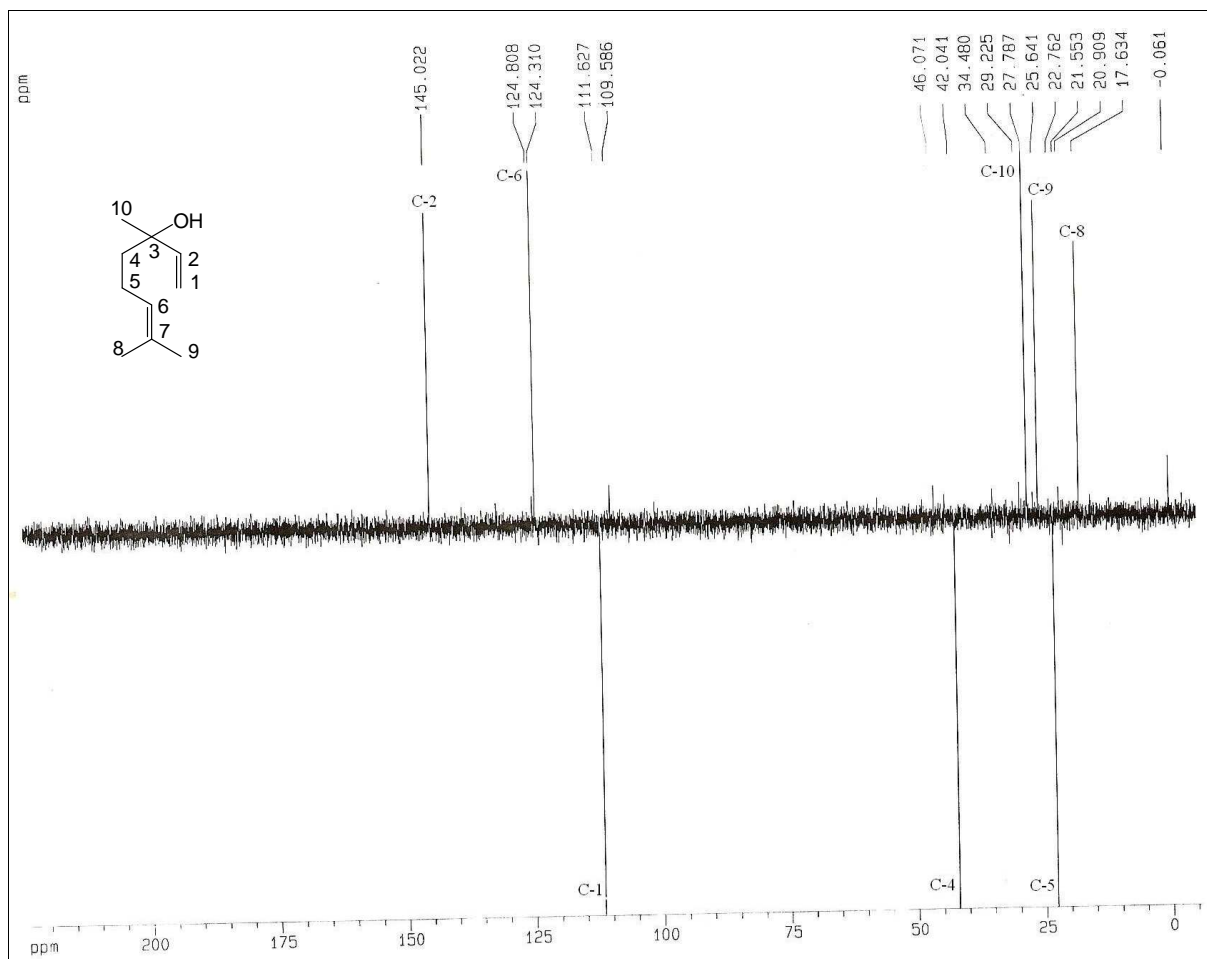


Figura 30 – Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135° do linalol (100 MHz, CDCl_3).

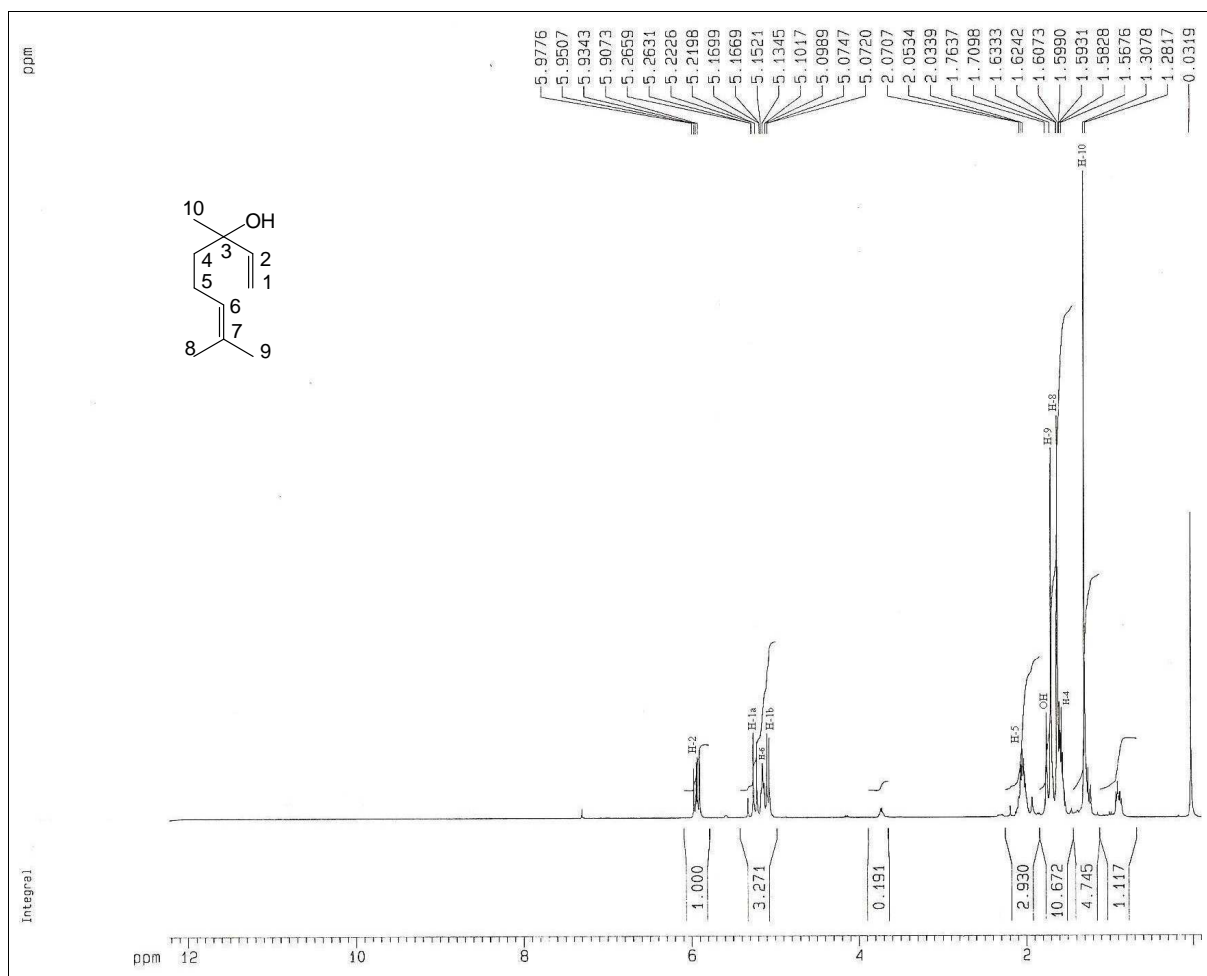


Figura 31 – Espectro de RMN ^1H do linalol (400 MHz, CDCl_3).

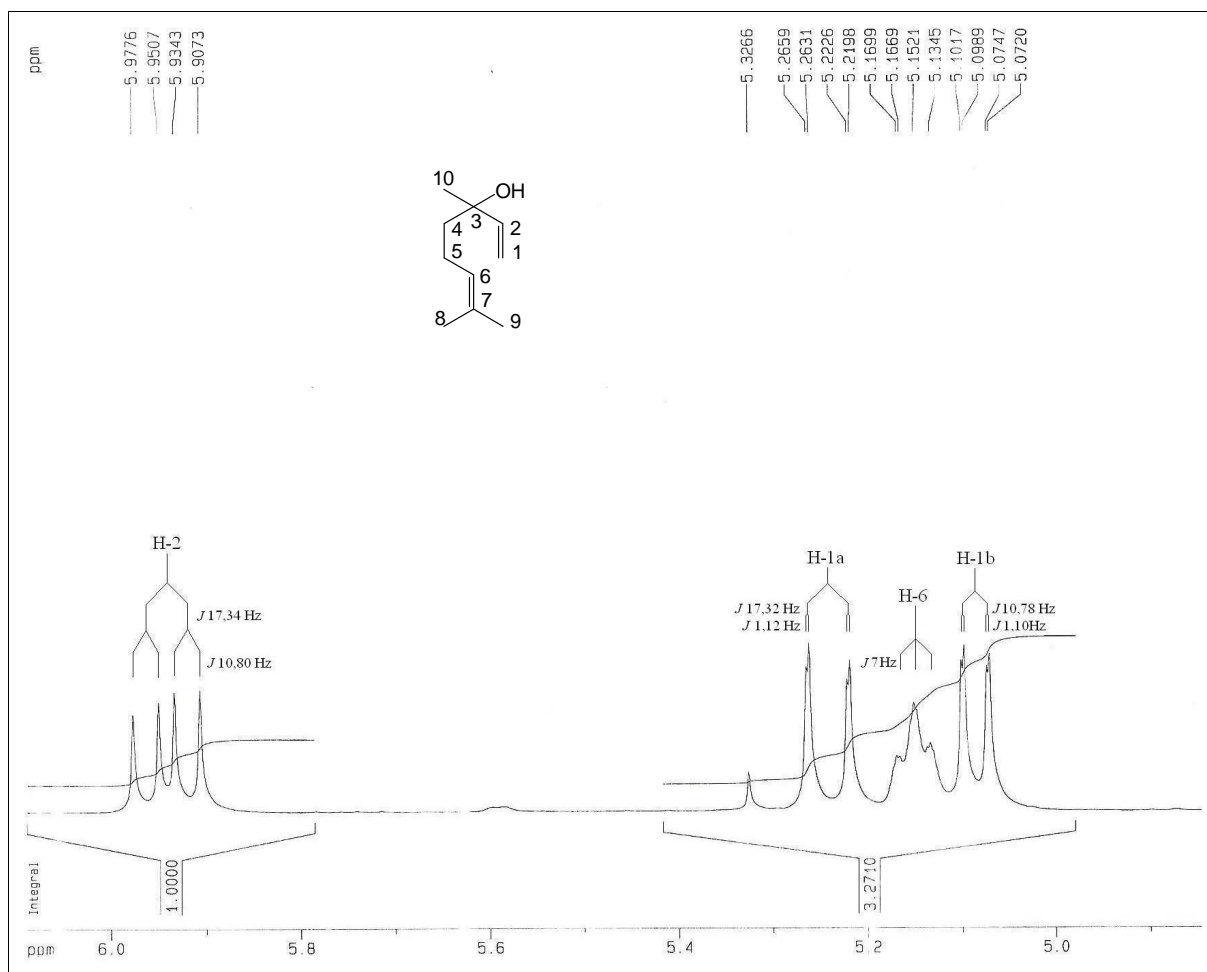


Figura 32 – Ampliações do espectro de RMN ^1H do linalol na região de δ 5,00 a 6,00 ppm (400 MHz, CDCl_3).

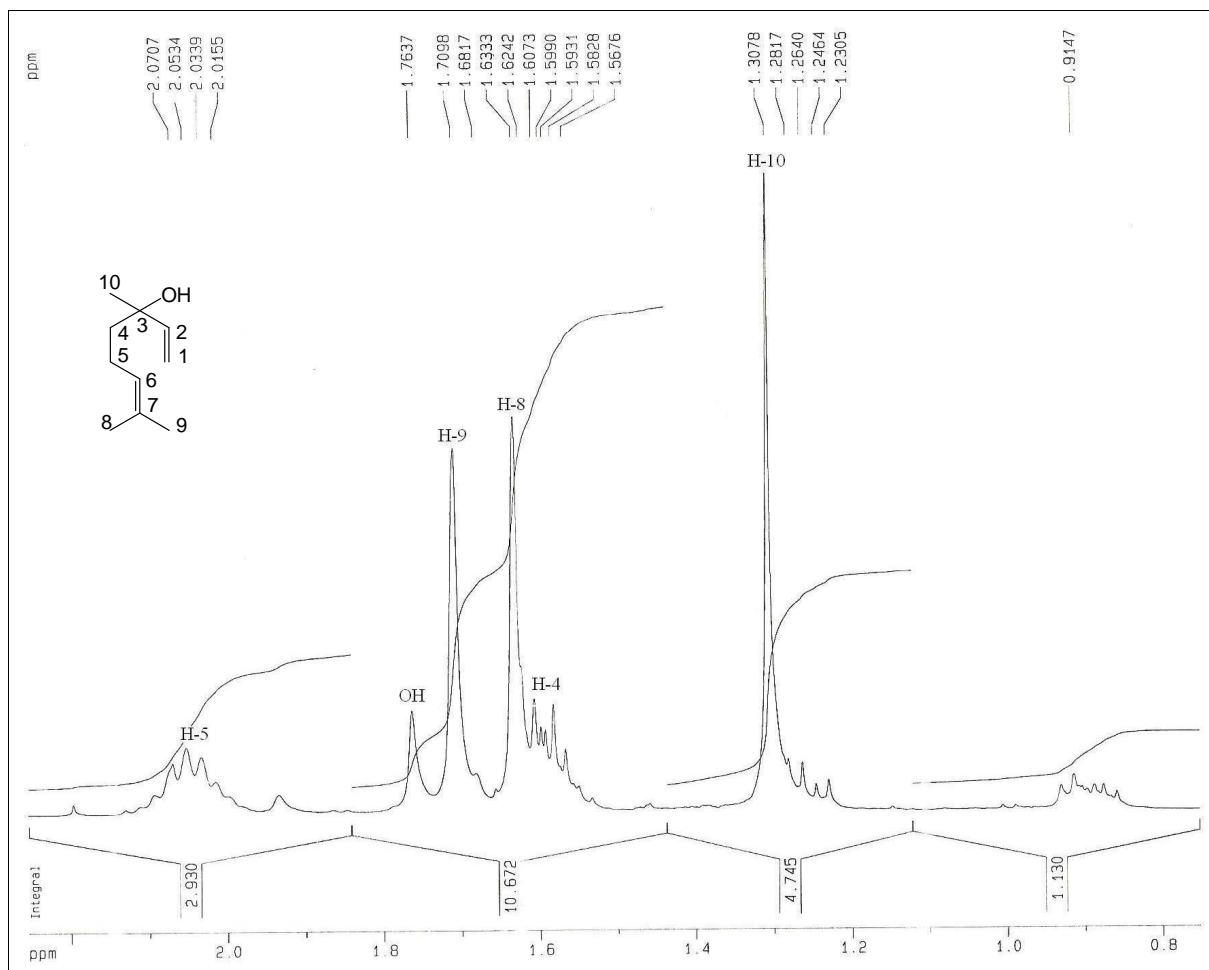


Figura 33 – Ampliações do espectro de RMN ^1H do linalol na região de δ 0,80 a 2,20 ppm (400 MHz, CDCl_3).

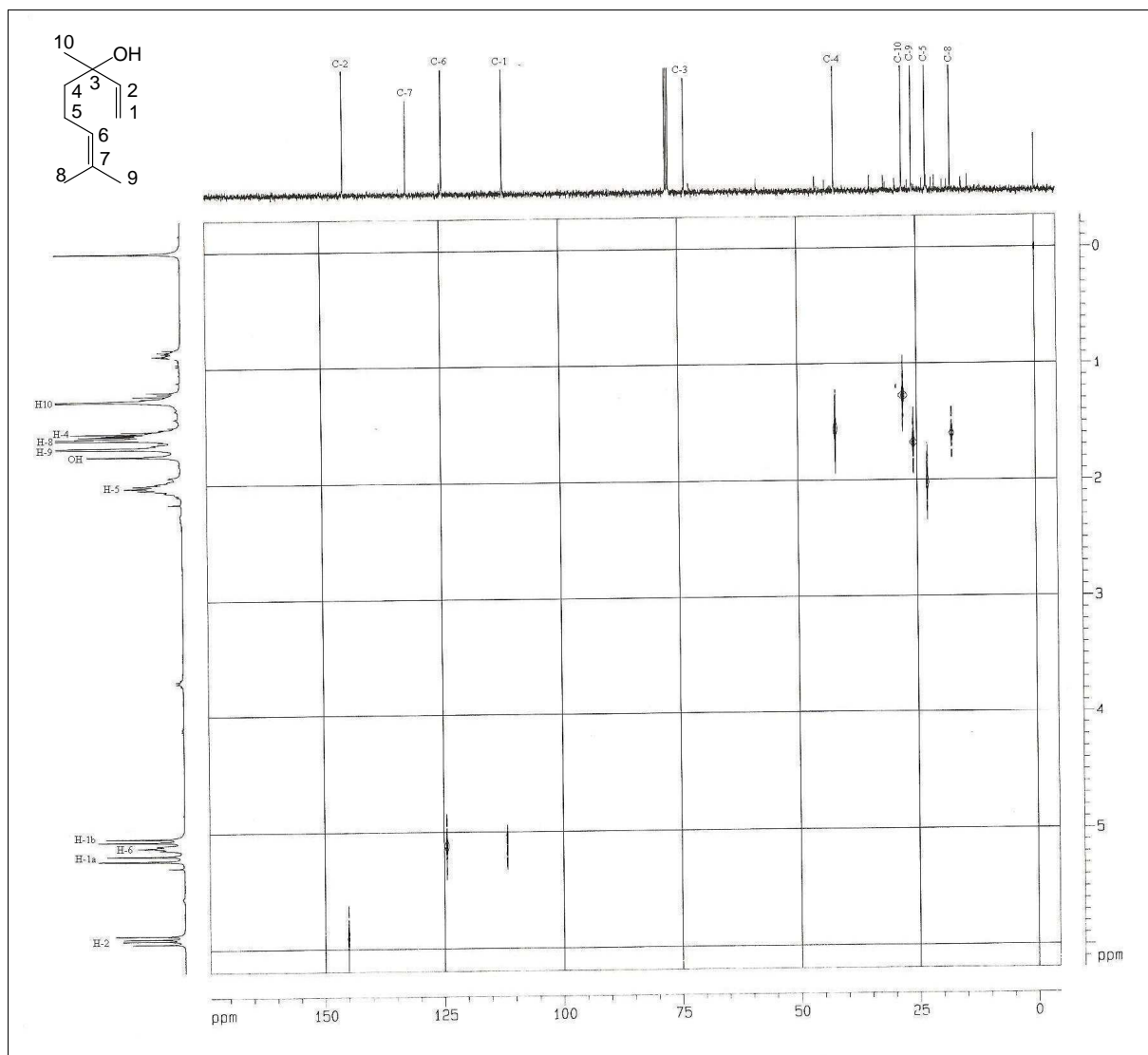


Figura 34 – Espectro de RMN de correlação heteronuclear (¹H-¹³C HETCOR) do linalol (400/100 MHz, CDCl₃).

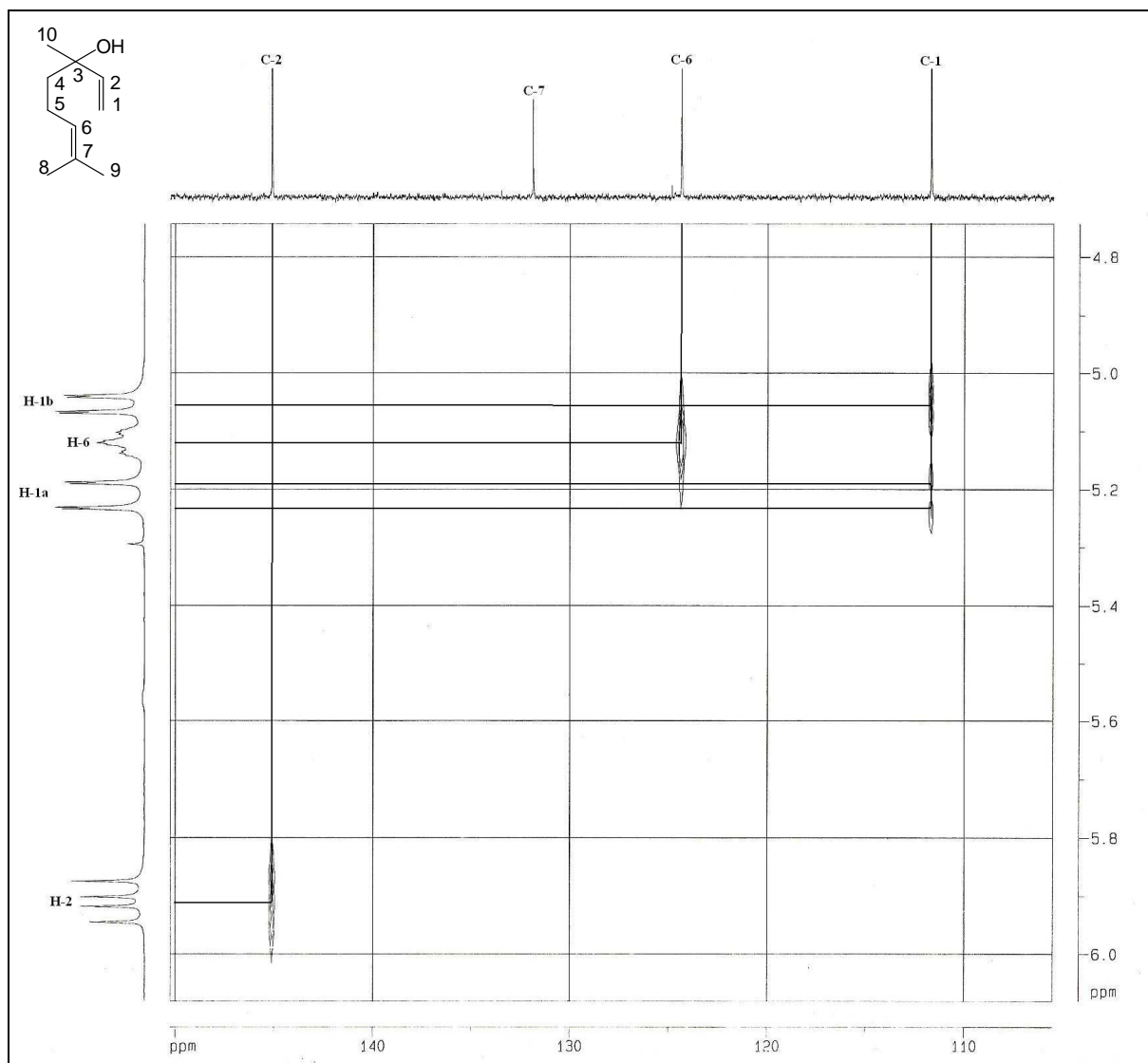


Figura 35 – Espectro expandido (campo baixo) de RMN de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C HETCOR) do linalol (400/100 MHz, CDCl_3).

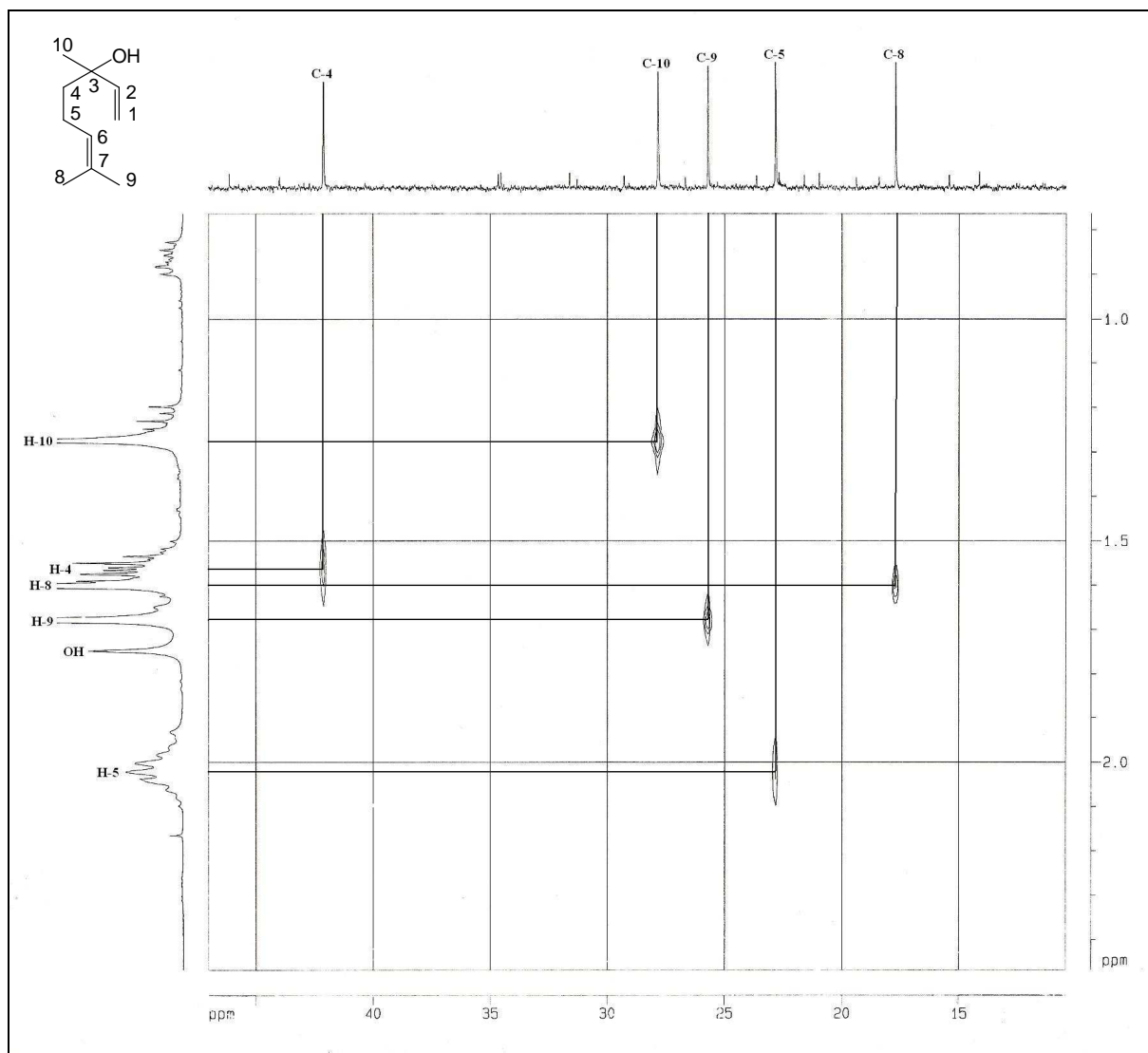


Figura 36 – Espectro expandido (campo alto) de RMN de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C HETCOR) do linalol (400/100 MHz, CDCl_3).

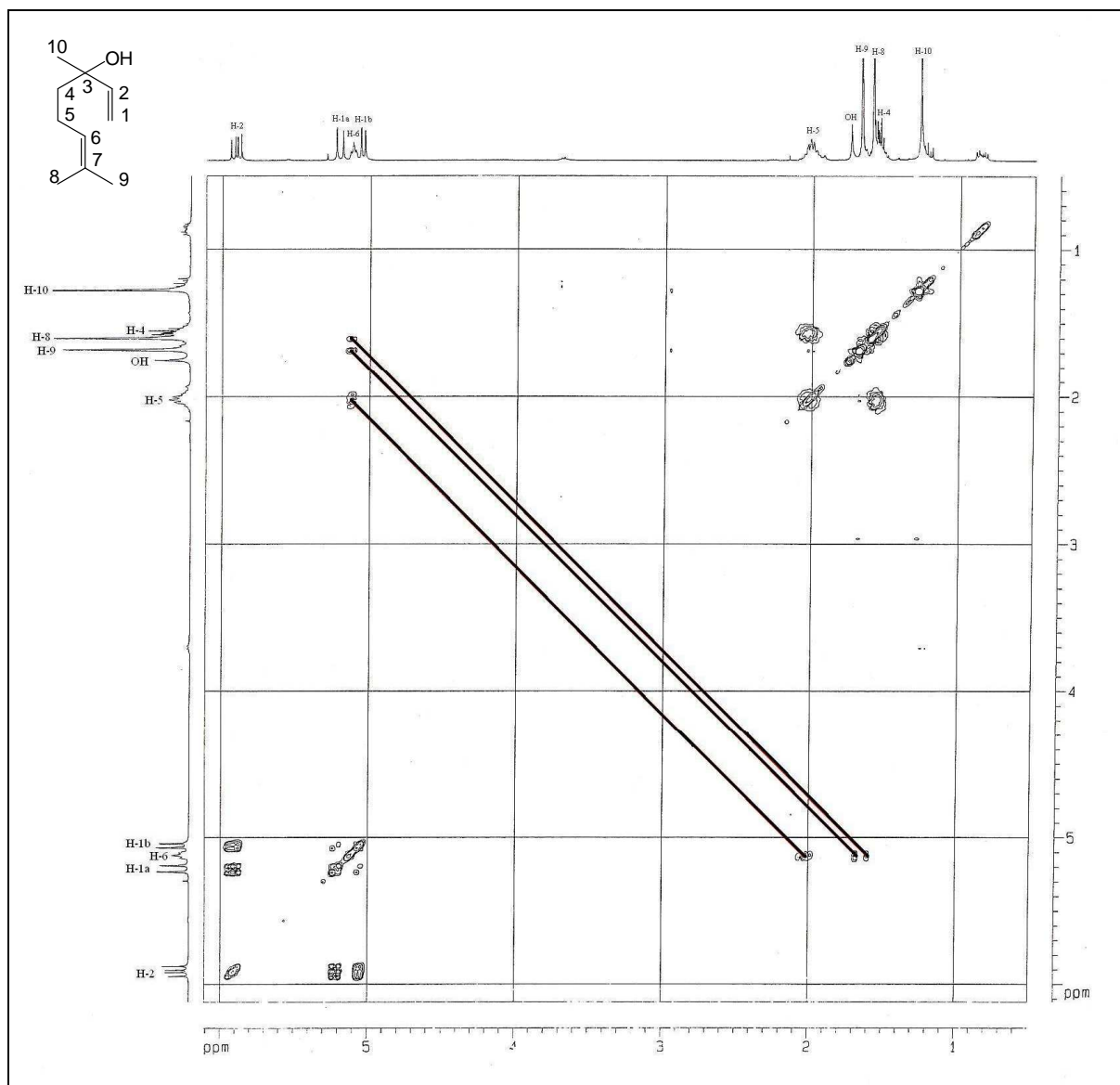


Figura 37 – Espectro de RMN de correlação homonuclear (^1H - ^1H COSY) do linalol (400 MHz, CDCl_3).

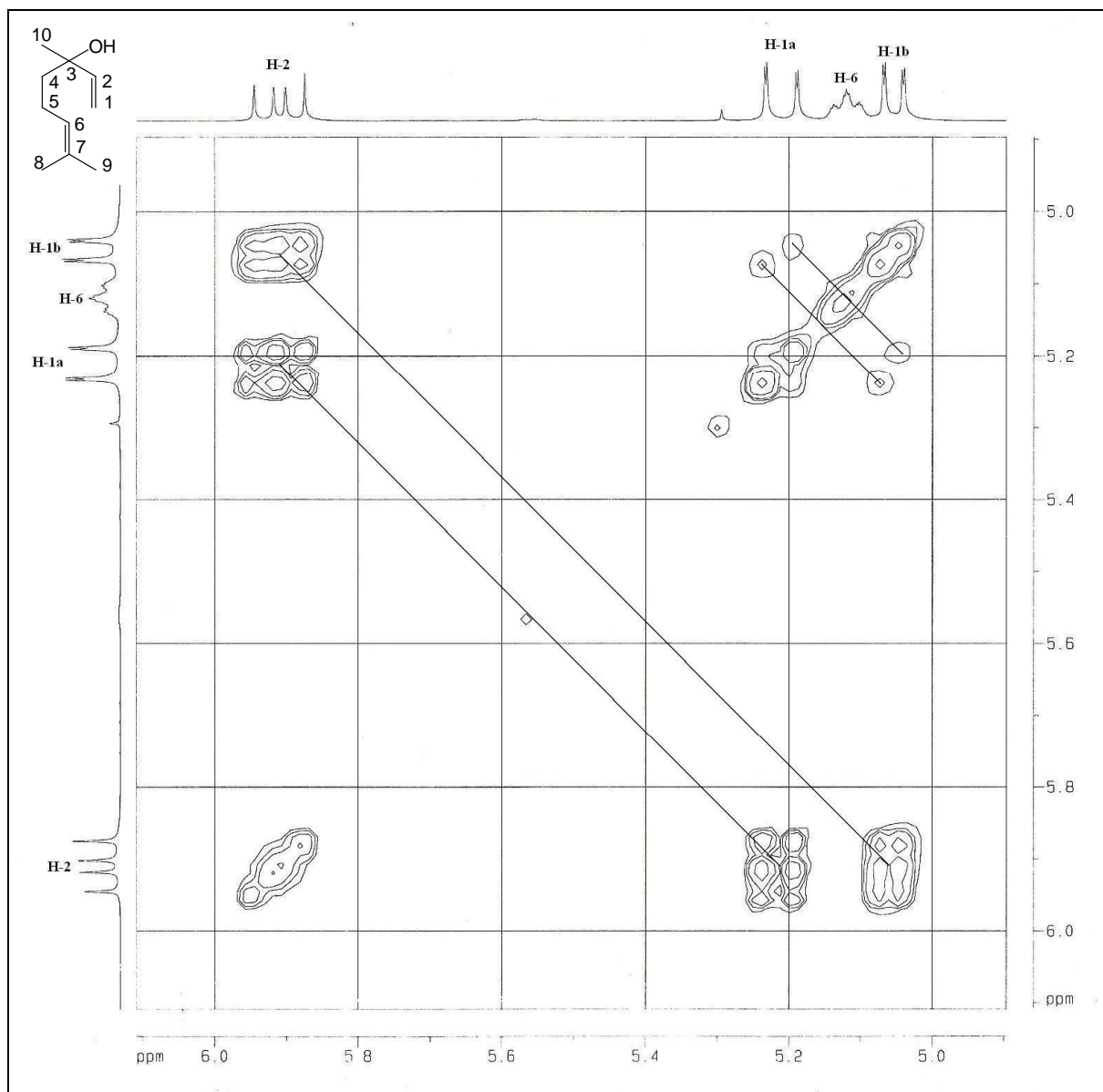


Figura 38 – Espectro expandido (campo baixo) de RMN de correlação homonuclear (^1H - ^1H COSY) do linalol (400 MHz, CDCl_3).

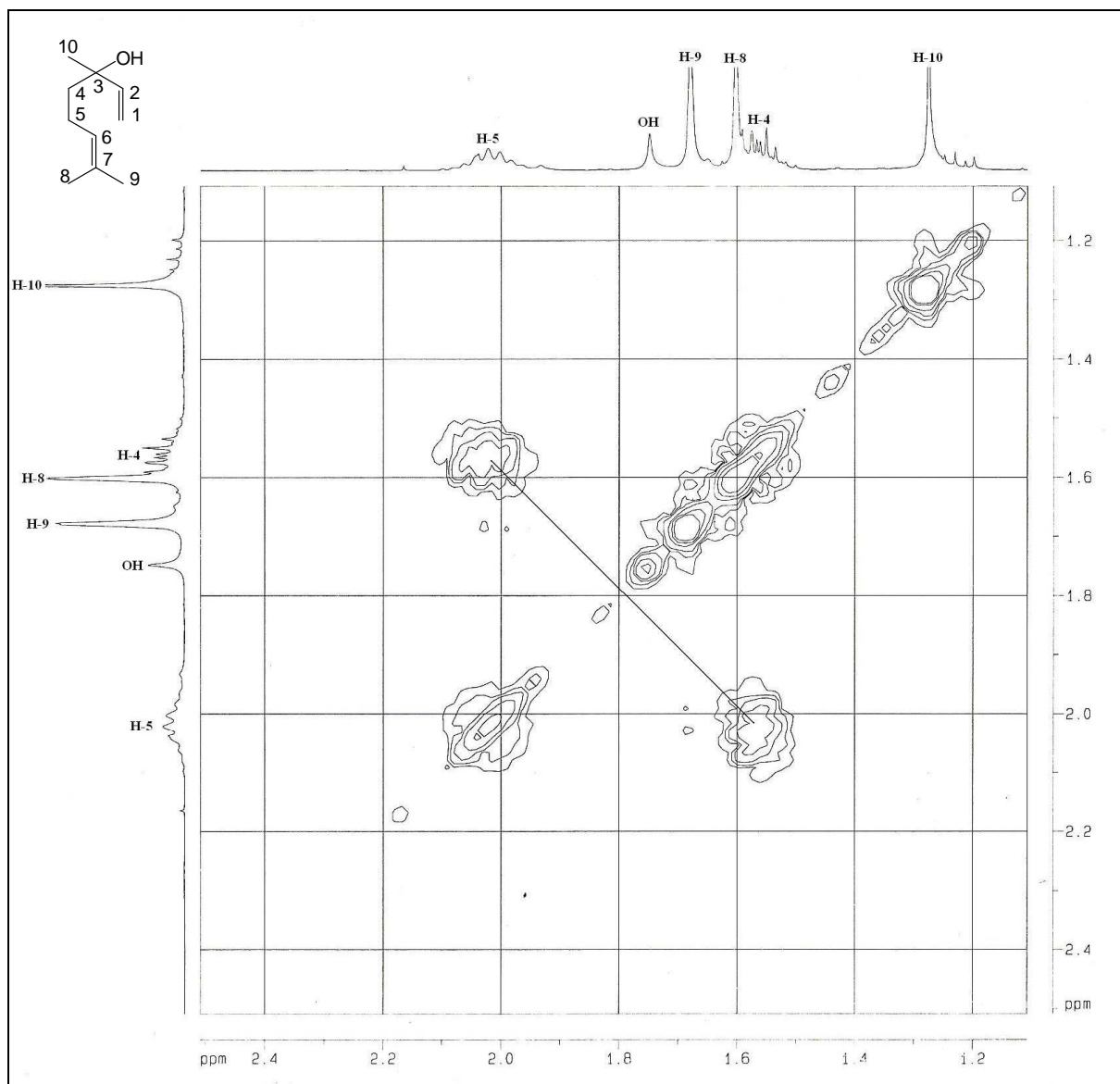


Figura 39 – Espectro expandido (campo alto) de RMN de correlação homonuclear (^1H - ^1H COSY) do linalol (400 MHz, CDCl_3).