

Caracterização química e atividade biológica do óleo essencial de *Lippia alba* cultivada no Paraná

Nogueira, M.A.^{1*}; Diaz, G.²; Sakumo, L.³

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, MG, Brasil.

²Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

³Departamento de Farmácia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, Brasil.

Recebido 26/09/2007 / Aceito 07/04/2008

RESUMO

As amostras de óleo essencial de folhas frescas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (*Verbenaceae*) coletadas nas quatro estações do ano e usadas popularmente no Brasil contra doenças estomacais, assim como antibacterianas e como anti-séptico, foram analisadas por CG/EM e avaliadas para atividade antibacteriana. Os resultados mostraram que as amostras deste óleo foram efetivas contra as bactérias *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, e *Staphylococcus intermedius* confirmando seu uso tradicional para essas doenças.

Palavras-chave: atividade antibacteriana, óleo essencial, *Lippia alba*.

INTRODUÇÃO

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown pertence à família *Verbenaceae*, é conhecida popularmente como erva-cidreira e consagrada pelo uso na medicina popular (Corrêa, 1992). O gênero *Lippia* consiste em 200 espécies amplamente distribuídas na América do Sul, América Central e África (Zoghbi et al., 1998). No Brasil, ocorre praticamente em todas as regiões, apresentando extensa sinonímia popular: região norte (carmelitana, erva-cidreira-do-campo, salva-do-brasil); nordeste (cedrilha, chá-do-tabuleiro, cidreira-brava, chá-da-terra); sudeste (falsa-melissa); sul (alecrim-do-campo, cidrão, salsa-limão, sálvia, lípia, malmequer-do-mato, malva, salva, salva-limão, e tomilho-do-mato) (Corrêa, 1992). Popularmente suas folhas são usadas como antiespasmódicas, estomáquicas, carminativas, calmante, digestivo, no combate à insônia, asma e em doenças bucais devido às suas propriedades bactericidas, anti-sépticas e adstringente (Silva et al., 1995).

L. alba é uma espécie que pode apresentar aromas diversificados. A presença de citral (geranial e neral) associado ao *d*-limoneno como um de seus constituintes principais é responsável pelo seu odor mais agradável (Matos, 1996). O aroma está relacionado aos constituintes predominantes na essência, os quais podem variar qualitativa ou quantitativamente em função de diversos fatores, tais como: estações do ano, época de floração, idade da planta, quantidade de água circulante resultante da precipitação e fatores geográficos e climáticos (Corrêa, 1992). A composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão e característica para o seu estágio de desenvolvimento (Simões et al., 2002), mas as condições ambientais são capazes de causar variações significativas, dando origem aos quimiotipos ou raças químicas tão frequentes em plantas ricas em óleos essenciais. Isto significa que as diferenças na composição dos diferentes quimiotipos da espécie *L. alba* não constituem um produto só da influência de fatores ambientais, mas refletem também a variação genotípica destas plantas (Tavares et al., 2005).

Oliveira et al. (2006) relatam que os quimiotipos da espécie *L. alba* já identificados são: mirceno-citral, limoneno-citral (Matos, 1996); limoneno-carvona (Matos, 1996; Pino et al., 1997; Zoghbi et al., 1998); limoneno-1,8-cineol, citral-germacreno-D (Zoghbi et al., 1998); β -cariofileno-citral (Craveiro et al., 1981); linalol-1,8-cineol (Atti-Serafini et al., 2002); limoneno-piperitona (Senatore & Rigano, 2001); cânfora-1,8-cineol (Dellacassa et al., 1990); citral (Castro et al., 2002); γ -terpineno (Gomes et al., 1993); linalol (Frighetto et al., 1998; Lorenzo et al., 2001) e carvona (Alea et al., 1997).

Esse estudo relaciona-se a caracterização química e atividade biológica do óleo essencial de *L. alba* cultivada na região Oeste do Paraná, considerando as diferentes estações do ano (primavera, verão, outono e inverno).

*Autor correspondente: Marisa Alves Nogueira Diaz - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - Universidade Federal de Viçosa, UFV - Av. P. H. Rolfs, s/nº - CEP 36570-000 - Viçosa - MG - Brasil - Telefone: (31) 3899-3041 - Fax: (31) 3899-2373 - e-mail: marisanogueira@ufv.br.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das Folhas de *L. alba*

As folhas de *L. alba* (Mill.) N. E. foram coletadas do horto de plantas medicinais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), campus de Cascavel, região Oeste do Paraná (PR), com clima característico do tipo subtropical. Todas as coletas foram realizadas em datas representativas de cada estação do ano (outono, inverno, primavera e verão) respectivamente em maio, agosto e novembro de 2004 e fevereiro de 2005. As coletas foram realizadas as 8:00 h. A planta foi identificada pela Prof.^a Dra. Norma Catarina Bueno, com exsicata depositada no Herbário da Universidade - HUNOP, registro 2281.

Extração do Óleo Essencial

As amostras de óleo essencial de *L. alba* foram extraídas das folhas secas e moídas por hidrodestilação em aparelho de Clevenger, por um período de oito horas. As porções do óleo obtido foram acondicionados em frascos de vidro e armazenados no freezer até serem estudadas. O teor do óleo essencial das diferentes amostras foi expresso em porcentagem massa/massa (g de óleo por 100 g de matéria seca).

Identificação dos Constituintes Químicos

As amostras de óleo essencial obtidas foram submetidas à análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas em aparelho Shimadzu QP2000A, utilizando-se coluna capilar SE-30 (polidimetilsiloxana) de 60m, tendo hélio como gás de arraste (fluxo de 1,0mL/min) e temperaturas programadas: 60 a 280°C, a 3°C/min. O volume injetado foi de 2 µL de óleo puro, temperatura de injeção: 220°C, temperatura do detector de massas (quadrupolo): 250°C, temperatura da interface: 200°C, fonte de íons: 250°C (70 elétrons-volt). Os constituintes do óleo essencial foram identificados através dos estudos dos espectros de massas, complementados por comparação computadorizada da biblioteca do aparelho, e literatura (Adams, 1995).

Atividade antimicrobiana

Em discos de papel de filtro com 5mm de diâmetro foram colocados 5 µL de óleo essencial de cada estação do ano e 2 µL da solução oftálmica LOPROX® (ciclopirox olamina 10mg/mL) como controle antimicrobiano (Van Den Berghe & Vlietinck, 1991). As placas de Petri foram colocadas na capela de fluxo laminar e em seguida foi acrescentado o meio de cultura agar Mueller Hinton (MHA). Depois do meio resfriado acrescentou-se 0,4 mL das bactérias padronizadas a 0,5 da escala de Mc Farland (1,5 x 10⁸ UFC/mL) as quais foram distribuídas uniformemente com auxílio de uma alça de Drigalski. Os discos de papel

impregnados com as amostras de óleo essencial foram colocados sobre as placas semeadas, com auxílio de uma pinça. As placas foram incubadas à temperatura de 35-37°C por 24 horas. Após este período foram feitas as leituras dos halos de inibição.

RESULTADOS

Em relação à análise sazonal das amostras do óleo essencial das folhas de *L. alba*, os melhores rendimentos foram observados com as amostras das folhas coletadas na primavera e verão apresentando teores de 0,54% e 0,38%, respectivamente. Os menores rendimentos foram observados no inverno (0,13%) e outono (0,19%).

Na Tabela 1 são apresentadas as porcentagens (expressa em área) dos constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *L. alba* coletadas nas diferentes épocas do ano. Foram identificados 15 compostos, sendo o componente majoritário o composto *trans*-dihidrocarvona com concentrações altas na primavera e verão onde o teor de óleo essencial foi maior. Outros compostos como citral (mistura de neral e geranial), β-cariofileno e germacreno-D também foram encontrados em maior proporção na mesma época do ano.

A Tabela 2 apresenta dados de temperatura e umidade relativa do dia da coleta das folhas de *L. alba*, enquanto a Figura 1 mostra os índices pluviométricos registrados na estação de Campo Mourão-PR em 2004 e 2005.

Os resultados da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. alba* são apresentados na Tabela 3.

DISCUSSÃO

A *L. alba* cultivada em Cascavel região Oeste do Paraná, rica em *trans*-dihidrocarvona e citral difere da cultivada em Curitiba região Norte do Paraná rica em γ-terpineno (Castro et al., 2002). Isto significa que plantas cultivadas em regiões diferentes podem apresentar variações na constituição química mesmo sendo plantas da mesma espécie.

A variação do teor de metabólitos secundários em plantas está sujeita a diversos fatores. Dentre eles, encontra-se a composição genética da planta. A variação sazonal dos metabólitos secundários pode ser causada por demandas fisiológicas como crescimento, defesa e reprodução, por outro lado, também pode ser causada por diversidades no meio ambiente como estresse hídrico, luz, deficiência de nutrientes, temperaturas extremas, poluição e a presença e/ou ausência de microrganismos patogênicos. O estudo desta variação é muito importante, pois permite conhecer a época exata ou quase exata em que alguns constituintes estão em maior proporção, podendo estar relacionado com a resistência ou susceptibilidade a ataques por microrganismos ou insetos herbívoros (Darrow & Bowers, 1997).

Caracterização do óleo essencial de *Lippia alba*

Tabela 1 - Caracterização química e teor do óleo essencial de *L. Alba*.

Estações	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Rendimento (%)	0,54	0,38	0,19	0,13
Substâncias	Área (%)			
1-octen-3-ol	4,0	4,2	6,0	8,0
mirreno	-	0,36	0,48	5,0
linalol	0,3	0,20	0,52	8,0
neral	6,0	7,2	24	20
geranial	5,8	7,8	38	34
<i>trans</i> -sabinol	0,2	1,8	0,4	0,8
acetato de geraniol	0,1	1,3	0,36	1,7
β -cariofileno	7,4	6,3	22	5,5
β -farneseno	0,3	3,2	1,0	2,0
germacreno-D	5,0	3,7	3,3	2,3
δ -cadinol	3,6	0,29	0,46	0,35
<i>cis</i> -nerolidol	0,4	3,2	0,5	0,48
óxido de cariofileno	0,5	5,8	2,98	0,67
<i>trans</i> -dihidrocarvona	61,3	52,2	-	-
mirtenol	-	-	-	11,2

Tabela 2 - Dados de temperatura e umidade relativa do dia da coleta das folhas de *L. alba*.

Estações do Ano	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Umidade Relativa (%)	Teor de Óleo Essencial (%)
14/05/2004 (Outono)	18-20	14-16	90-100	0,19
14/08/2004 (Inverno)	22-24	8-10	80-90	0,13
14/11/2004 (Primavera)	28-30	16-18	80-90	0,54
14/02/2005 (Verão)	30-32	16-18	80-90	0,38

FONTE: INMET [2005].

Caracterização do óleo essencial de *Lippia alba*

Sabe-se que as condições extremas de temperatura e estresse hídrico são desfavoráveis para a produção de óleo essencial nas plantas. O mês de maio de 2004 (representativo do outono) apresentou alto índice pluviométrico, maior que 280 mm e em agosto (representativo do inverno) o índice pluviométrico foi próximo a zero (Figura 1). Nos dias das coletas representativas das estações outono e inverno, as temperaturas foram as menores observadas em relação às outras coletas (Tabela 2). No inverno, o teor de óleo essencial foi o menor, 0,13% e no outono, o teor óleo apresentado foi de 0,19%.

A produção de óleo essencial no verão de 2005 foi prejudicada devido à falta de chuva no mês de fevereiro (Figura 1), sendo que o teor observado foi de 0,38%. A primavera foi a estação que apresentou condições climáticas mais favoráveis para a produção de óleo essencial de *L. alba* (0,54%) (Tabela 2).

Neste estudo, durante a primavera e o verão, o teor de óleo essencial de 0,54% e 0,38%, respectivamente, e do composto *trans*-dihidrocarvona foram os maiores. Estas variações sugerem que tanto a constituição química como as porcentagens relativas das diferentes amostras do óleo essencial foram alteradas nas diferentes estações do ano, podendo estar relacionados também aos períodos de floração e vegetivo. De acordo com Tavares et al. (2005), o menor rendimento do teor de óleo essencial em plantas de *L. alba* foi observado na época de floração, esta observação também foi confirmada neste trabalho onde o teor de óleo essencial foi menor nesta época (0,13%).

As amostras de óleo essencial obtidas nas quatro estações do ano foram submetidas a ensaios biológicos para atividade antibacteriana (Tabela 3). O óleo essencial extraído durante o verão apresentou atividade ótima, com os halos

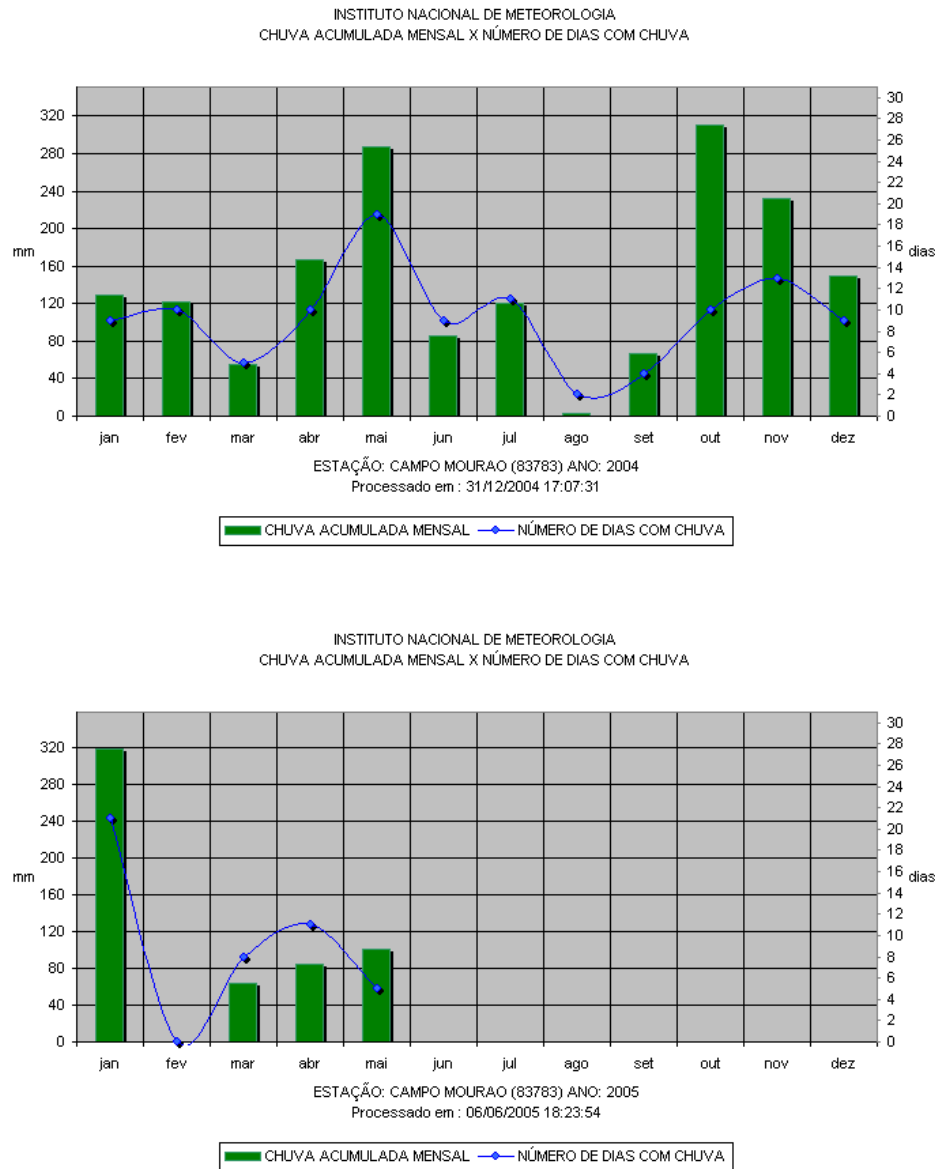


Figura 1. Índice pluviométrico registrado na estação de Campo Mourão - PR em 2004 e 2005.

Caracterização do óleo essencial de *Lippia alba*

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. alba* coletado nas quatro estações do ano.

Microorganismo	Controle ^a	Outono ^b	Inverno ^b	Primavera ^b	Verão ^b
<i>Acinetobacter baumannii</i> *	12,0	17,0	16,0	16,0	25,0
<i>Bacillus subtilis</i>	10,0	14,0	10,0	15,0	16,0
<i>Escherichia coli</i>	12,0	10,0	12,0	9,00	15,0
<i>Staphylococcus intermedius</i>	12,0	11,0	12,0	12,0	14,0

^aCiclopírox Olamina 2 µg/disc; ^b5 µL do óleo/disc; ^cmédia de três repetições; *= bactéria Multi-droga resistente.

de inibição superiores aos halos de inibição dos óleos das outras estações e do controle ciclopírox olamina. Estes resultados estão de acordo com o uso folclórico desta planta para doenças infecciosas confirmando seu uso etnofarmacológico contra bactérias que causam infecção respiratória, estando esta atividade associada à presença de geranial, germacreno-D e linalol (Caceres et al., 1993; Pino et al., 1997). Outro fator que poderia estar contribuindo para uma maior atividade antibacteriana no verão seria a presença do *trans*-dihidrocarvona, substância esta encontrada em grande quantidade nesta época do ano (Nogueira et al., 2007).

ABSTRACT

Chemical characterization and biological activity of essential oil from Lippia alba

Fresh leaves of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae), used as a popular medicine in Brazil for stomach disorders, as an antiseptic and an antibiotic, were collected in all four seasons. Essential oil from the leaves was analyzed by GC/MS and assayed for antibacterial activity. The oil showed effective activity against test strains of the bacteria *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus intermedius*, confirming its traditional use.

Keywords: antibacterial activity, essential oil, *Lippia alba*.

REFERÊNCIAS

Adams RP. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Carol Stream: Allured Publishing Corp.; 1995.

Alea JAP, Luis AGO, Pérez AR, Jorge MR, Baluja R. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. *Rev Cub Farm* 1997; 30:1-6.

Atti-Serafini L, Pancera MR, Atti, SAC, Rossato M, Pauletti GF, Rotal D, Parooul N, Moyna P. Variation in essential oil yield and composition of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br grows in southern Brazil. *Rev Bras Plant Med* 2002; 4:72-4.

Caceres A, Fletes L, Aguilar L, Ramirez O, Figueroa L, Taracena AM, Samayoa B. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. *J Ethnopharmacol* 1993; 38:31-8.

Castro DM, Ming LC, Marques MOM. Composição fitoquímica dos óleos essenciais de folhas da *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br em diferentes épocas de colheita e partes do ramo. *Rev Bras Plant Med* 2002; 4:75-9.

Corrêa CBV. Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britt. & Wilson erva-cidreira. *Rev Bras Farm* 1992; 73:57-64.

Craveiro AA, Alencar W, Matos FJ, Andrade HS, Machado MIL. Essential oils from Brazilian Verbenaceae. Genus *Lippia*. *J Nat Prod* 1981; 44:598-601.

Darrow K, Bowers MD. Phenological and population variation in iridoid glycosides of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). *Biochem Syst Ecol* 1997; 24:1-11.

Dellacassa E, Soler E, Menéndez P, Moyna P. Essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown and *Aloysia chamaedrifolia* Cham. (Verbenaceae) from Uruguay. *Flav Frag J* 1990; 5:107-8.

Frighetto N, Oliveira JG, Siani AC, Chagas KC. *Lippia alba* Mill N. E. Br. (Verbenaceae) as a source of linalool. *J Essen Oil Res* 1998; 10:578-80.

Gomes EC, Ming LC, Moreira EA, Miguel OG. Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br (Verbenaceae). *Rev Bras Farm* 1993; 74:29-32.

Caracterização do óleo essencial de *Lippia alba*

- Lorenzo D, Paz D, Davies P, Vila R, Canigueral S, Dellacassa E. Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown from Uruguay. *Flav Frag J* 2001; 16:356-9.
- Matos FJA. As ervas cidreiras do Nordeste do Brasil estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). *Rev Bras Farm* 1996; 77:137-41.
- Nogueira MA, Diaz, G, Sakumo L. Antibacterial activity of *Lippia alba* (lemon herb). *Lat Am J Pharm* 2007; 26:404-6.
- Oliveira DR, Leitão GG, Santos SS, Bizzo HR, Lopes D, Alviano CS, Alviano DS, Leitão SG. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. *J Ethnopharmacol* 2006; 108:103-8.
- Pino JA, Ortega LAG, Rosado PA, Rodríguez JM, Baluja R. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Rev Cub Farm* 1997; 30:29-35.
- Senatore F, Rigano D. Essential oil of two *Lippia* spp (Verbenaceae) growing wild in Guatemala. *Flav Frag J* 2001; 16:169-71.
- Silva I, Franco SL, Molinari SL, Conegero CI, Miranda Neto MH, Cardoso MLC, Sant'ana DMG, Iwanko NS. *Noções sobre o organismo humano e utilização de plantas medicinais*. Cascavel: Editora Educativa; 1995. 100p.
- Simões CMO, Schenkel EP, Gosmam G, Mello, JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Florianópolis: Editora da UFSC; 2002. 821p.
- Tavares ES, Julião ES, Lopes HD, 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.
- Van Den Berghe DA, Vlietinck AJ. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: Hostettman K, editor. *Methods in plant biochemistry, assays for bioactivity*. London: Academic Press; 1991. v.6, p.47-69.
- Zoghbi MDGB, Andrade EHA, Santos AS, Silva MHL, Maia JGS. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown growing wild in the Brazilian Amazon. *Flav Frag J* 1998; 13:47-8.