



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

RONNEY DE SOUSA RAMOS

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TIPOS DE EXTRAÇÃO AQUOSA NA
COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS DE *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown**

CEILÂNDIA,DF

2015

RONNEY DE SOUSA RAMOS

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TIPOS DE EXTRAÇÃO AQUOSA NA
COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS DE *Lippia alba*(Mill.) N.E. Brown**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada
como requisito parcial para obtenção do grau de
Farmacêutico, na Universidade de Brasília,
Faculdade de Ceilândia.

Orientadora: MSc. Tamara Ângelo de Oliveira Santos Damasceno
Co-orientadora: Dra. Paula Melo Martins

CEILÂNDIA,DF

2015

RONNEY DE SOUSA RAMOS

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TIPOS DE EXTRAÇÃO AQUOSA NA
COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS DE *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown**

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a MSc. Tamara Ângelo de Oliveira Santos Damasceno
(Orientadora)
(FCE/ Universidade de Brasília)

Profa. Dr^a Paula Melo Martins
(Co-orientadora)
(FCE/Universidade de Brasília)

Prof. Dr. Christopher William Fagg
(FCE/ Universidade de Brasília)

Prof. MSc. Breno Noronha Matos
(FS/ Universidade de Brasília)

CEILÂNDIA,DF

2015

AGRADECIMENTOS

A Deus, por se fazer presente e por fazer com que minhas idealizações fossem suas vontades.

À minha família, por compreender o sentido profissional e pessoal da realização deste trabalho.

À minha orientadora e amiga, Professora MSc Tamara Ângelo de Oliveira Santos Damasceno, por ter me acolhido com sua generosidade e pela forma sutil e surpreendente com que ensina. A maneira simples de encarar os obstáculos, sem menosprezá-los e o seu olhar crítico e sensato fizeram toda diferença na minha formação.

À minha co-orientadora professora Dra. Paula Melo Martins, por mesmo estando longe ter ajudado na elaboração do meu trabalho e ter aceitado a participação na banca de defesa, e por toda dedicação à correção do meu trabalho. Suas opiniões foram valiosas e enriquecedoras.

Ao Professor Dr. Christopher William Fagg por ter aceitado participar da banca de defesa, contribuindo com todo seu conhecimento.

Ao Professor MSc. Breno Noronha Matos por ter aceitado participar da banca de defesa e pelas discussões e sugestões tão proveitosas.

À Professora Dra. Maria Hosana Conceição, por ter contribuído no desenvolvimento do trabalho.

Aos Professores Guilherme Martins Gelfuso, Marcílio Sérgio Soares da Cunha Filho e Taís Gratieri do Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos da Faculdade de Saúde – UnB por concordarem que as análises de cromatografia fossem executadas em seu laboratório.

Aos Funcionários do Laboratório da Faculdade de Ceilânida - Universidade de Brasília, pela disponibilidade e presteza com que sempre me auxiliaram.

Aos meus colegas de graduação por partilharem de um mesmo sonho.

A todos os meus amigos e àqueles que passaram por mim durante essa fase da minha vida e que de uma forma ou de outra contribuíram para meu crescimento pessoal e para realização deste trabalho.

RESUMO

A *Lippia alba* está amplamente distribuída pelo Brasil e outros países como México, Paraguai, Cuba, Argentina e Uruguai. Esse vegetal é utilizado como planta medicinal devido as suas várias propriedades farmacológicas. Tendo em vista uma possível aplicação do extrato da *L. alba* para o tratamento da ansiedade, no presente trabalho estudaram-se diferentes formas de extração das suas folhas a fim de se analisar qual método propiciava a maior concentração do marcador carvona. Foram testados diferentes tipos de extração: por soxhlet, decocção, extração como infuso e hima (maceração). As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para se obter uma quantificação confiável da carvona foi realizada a validação do método. Os parâmetros utilizados para essa validação foram: especificidade, linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção, e limite de quantificação. A extração que apresentou o maior teor da carvona foi a decocção, seguida pela infusão, extração por soxhlet e hima. Essas diferenças nos teores da carvona foram associadas às particularidades de cada método, principalmente em relação à temperatura e tempo empregados. Conclui-se que a decocção foi a melhor forma de obtenção da carvona em relação às demais avaliadas, o que representa uma importante vantagem por ser uma metodologia simples, econômica e acessível.

Palavras-chave: *Lippia alba*, carvona, extração, análises

ABSTRACT

Lippia alba is widely distributed in Brazil and other countries such as Mexico, Paraguay, Cuba, Argentina and Uruguay. This plant is used as an herb due its various pharmacological properties. Due to its possible use for the treatment of anxiety, in this study different extractive technique of *L. alba* leafs were studied in order to analyze which method propitiates the greatest concentration of carvone. Different types of extraction were tested: soxhlet, decoction, extraction as infusion and Hima (maceration). The analyses were conducted using high-performance liquid chromatography (HPLC). It was made a validation of the method to obtain a reliable analysis of carvone. The parameters used for this validation were: specificity, linearity, accuracy, precision, limit of detection and limit of quantification. The extraction that presented the highest concentration of carvone was decoction, followed by infusion, soxhlet extraction and hima. These differences on the content of carvone were associated to particularities of each extraction method especially in relation to temperature and time. In conclusion, decoction was the best way to obtain carvone in relation to the other methods evaluated, which represents an important advantage for being a simple, economical and accessible methodology.

Key words: *Lippia alba*, carvone, extraction, analyses

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Unidade isoprênica e isopreno (Fonte: Oliveira, 2009).	18
Figura 2. <i>Lippia alba</i> : Detalhe de folhas opostas e flores róseo-arroxeadas (Fonte: JANUZZA, 2006)	19
Figura 3. Rota para biossíntese de (-)-carvona a partir de precursores primários isopentenil-difosfato (IPP) e dimetil-al II-difosfato (DMAPP). Enzimas indicadas: 1. geranyl difosfato sintase, 2. limoneno sintase, 3. citocromo P450 limoneno-6-hidroxilase, 4. carveol desidrogenas (Fonte: Silva, 2005)	21
Figura 4. Estrutura enantômerica da carvona (Fonte: Silva, 2011)	22
Figura 5. <i>Lippia alba</i> – Horto de plantas medicinais, aromáticas e condimentares da Faculdade de Ceilândia - UnB.....	34
Figura 6. Sistema de extração por Soxhlet	36
Figura 7. Perfil cromatográfico do padrão carvona. Cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 236 nm) com tempo de retenção de 10,21 minutos. Solvente metanol. Condições cromatográficas do método: coluna C18 de fase reversa: 15 cm x 4,6 mm x 5 µg/mL; fase móvel MeOH:H2O acidificada; temperatura 30° C; vazão 1,2 mL/min; volume de injeção de 20 µL.....	39
Figura 8. Perfil cromatográfico do extrato de <i>L. alba</i> . Cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 236 nm), com tempo de retenção de 10,21 minutos. Solvente metanol. Condições cromatográficas do método: coluna C18 de fase reversa: 15 cm x 4,6 mm x 5 µg/mL; fase móvel MeOH:H2O acidificada; temperatura 30° C; vazão 1,2 mL/min; volume de injeção de 20 µL.....	40
Figura 9. Curva de calibração e linearidade.	40
Figura 10. Gráfico de linearidade obtido a partir das concentrações 0,25; 0,50; 2,50; 5,00; 7,00; 10,00 e 12,50 µg/mL do padrão da carvona. R ² = 0,999.....	41
Figura 11. Características macroscópicas da folha de <i>Lippia alba</i>	42
Figura 12. Quantificação da carvona nos extratos de <i>Lippia alba</i> : infusão, decocção, hima e soxhlet.	45

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	27
Equação 2	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Precisão intermediária do padrão carvona.	41
Tabela 2. Valores de LD e LQ reais.	42
Tabela 3 - Determinação de água da <i>L. alba</i>	43
Tabela 4 - Determinação de cinzas totais <i>L. alba</i>	44

LISTA DE ABREVIATURAS

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CV% - Coeficiente de Variação

ICH - International Conference on Harmonisation

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MeOH – Metanol

UV-Vis – Ultravioleta – Visível

CRV ($\mu\text{g/g}$ de folha) – Micrograma de carvona por grama de folha

SUMÁRIO

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA FACULDADE DE CEILÂNDIA CURSO DE FARMÁCIA.....	1
INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TIPOS DE EXTRAÇÃO AQUOSA NA COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Brown.....	2
Orientadora: MSc. Tamara Ângelo de Oliveira Damasceno.....	2
Co-orientadora: Dra. Paula Melo Martins.....	2
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
SUMÁRIO	11
1. INTRODUÇÃO COM REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
1.1. Plantas medicinais e fitoterapia	14
1.2. Metabólitos Secundários.....	16
1.2.1. Terpenos.....	17
1.3. <i>Lippia Alba</i> : Descrição, propriedades farmacológicas e composição química ..	18
1.4. Carvona	20
1.5. Extração.....	22
1.5.1. Fatores que influenciam a extração	22
1.5.2. Hima (Infusão a frio)	24
1.5.3. Extração por Soxhlet.....	24
1.5.4. Infusão	25
1.5.5. Decocção	25
1.6. Metodologia para quantificação dos componentes majoritários do extrato vegetal: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	25
1.7. Validação do método analítico	26
1.7.1. Especificidade.....	26
1.7.2. Linearidade	26
1.7.3. Limite de detecção e limite de quantificação.....	27
1.7.4. Exatidão	28
1.7.5. Precisão	28
1.7.5.1. Precisão intermediária	28
1.7.5.2. Repetibilidade	28

2. JUSTIFICATIVA.....	30
3. OBJETIVOS.....	31
Objetivos Específicos.....	31
4. METODOLOGIA.....	32
4.1. Material.....	32
4.2. Métodos.....	32
4.2.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima do padrão	32
4.2.2. Método analítico para quantificação do fármaco.....	32
4.2.3. Validação do método analítico.....	33
4.2.3.1 Especificidade.....	33
4.2.3.2. Linearidade.....	33
4.2.3.3. Precisão.....	33
4.2.3.3.1. Repetibilidade.....	33
4.2.3.3.2. Precisão intermediária.....	33
4.2.3.4. Exatidão.....	33
4.2.3.5. Limites de detecção e quantificação.....	34
4.2.3.6. Coleta da <i>Lippia alba</i>	34
4.2.4. Caracterização da <i>Lippia alba</i> e obtenção da droga vegetal.....	35
4.2.4.1. Características organolépticas.....	35
4.2.4.2. Materiais estranhos.....	35
4.2.4.3. Obtenção da droga vegetal.....	35
4.2.4.4. Determinação de água.....	35
4.2.4.5. Cinzas totais.....	36
4.2.5. Obtenção dos extratos.....	36
4.2.5.1. Extração por Soxhlet.....	36
4.2.5.2. Hima (Maceração).....	37
4.2.5.3. Infusão.....	37
4.2.5.4. Extração por decocção.....	37
4.2.6. Liofilização.....	37
4.2.7. Preparação das amostras para análise por CLAE.....	38
5. Resultados.....	39
5.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima do padrão.....	39
5.2. Validação do Método.....	39
5.2.1. Especificidade.....	39

5.2.2. Linearidade	40
5.2.3. Precisão	41
5.2.4. Exatidão	41
5.2.5. LD e LQ	41
5.3. Caracterização da <i>Lippia alba</i>	42
5.3.1. Características Organolépticas	42
5.3.2. Materiais estranhos	43
5.3.3. Determinação de água	43
5.3.4. Cinzas totais	44
5.4. Rendimentos	44
5.5. Quantificação da carvona nos extratos	44
6. CONCLUSÃO	44
7. REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO COM REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Desde o início dos tempos, a humanidade tem buscado e acumulado conhecimentos sobre a utilização das plantas medicinais (SOUZA; RIBEIRO, 2008; PIRIZ et al., 2014). Com o passar dos anos, os estudos a respeito da utilização de plantas medicinais tem aumentado (ALBUQUERQUE et al., 2006).

Plantas medicinais são vegetais que sintetizam substâncias químicas que podem ser utilizadas direta ou indiretamente como tratamento ou prevenção de patologias (CASTRO et al., 2004).

Um exemplo de planta medicinal com importantes propriedades terapêuticas é a *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, Verbenaceae. As folhas e as raízes da *L. alba* sob forma de decocção, infusão, compressas, banhos ou extratos alcoólicos são utilizadas na medicina popular no tratamento de doenças hepáticas, como ansiolítico (TAVARES; MOMENTÉ; NASCIMENTO, 2011), analgésico, no tratamento de doenças cutâneas, antiespasmódica, em casos de sífilis, gonorréia, como anti-inflamatória e antipirética, além de auxiliar no tratamento de distúrbios menstruais (PASCUAL; SLOWING; CARRETERO, 2004). A *L. alba* também é bastante promissora na indústria farmacêutica na fabricação de aromáticos. Já na indústria química pode ser utilizada como antifúngica, inseticida e repelente (YAMAMOTO et al., 2006). Rossato et al. (2006) ainda cita que o óleo essencial de *L. alba* demonstra potencial antioxidante, semelhante ao efeito da vitamina E.

As substâncias ativas estão presentes nas plantas em concentrações variadas, e dependendo da metodologia empregada para se obter o extrato, alguns componentes químicos podem ser alterados (ROCHA et al., 2013). Dessa forma são necessários métodos extrativos eficientes e seletivos para a obtenção desses princípios ativos (LANG e WAI, 2001).

Levando em consideração a influência de diferentes tipos de extração na composição do extrato da *L. alba*, é de grande relevância a análise da influência dessas metodologias na obtenção do extrato da planta.

1.1. Plantas medicinais e fitoterapia

Uma vez que plantas medicinais são vegetais que possuem a capacidade

de secretar substâncias com propriedades terapêuticas (CASTRO et al., 2004), o uso dessas técnicas se caracteriza como uma fonte complementar para a manutenção da saúde da sociedade, e com a vantagem de ser uma fonte renovável (SIMÕES et al., 2004).

Existem registros antigos referentes à utilização de plantas medicinais, os quais relatam que a humanidade acreditava nesses vegetais como presentes divinos para serem utilizados como tratamento de enfermidades provenientes da terra (ELDIN & DUNFORD, 2001; OLIVEIRA et al., 2011).

Na China, a medicina tradicional é conhecida desde 2500 a.C. e sempre utilizou plantas medicinais no tratamento de enfermidades (SCHENKEL; GOSMAN; PETROVICK, 2003).

Outra abordagem a respeito de plantas medicinais bastante antigo conhecido pela humanidade é o sistema Ayurveda. Ele é um dos principais sistemas praticado na Índia, além de ser também um dos sistemas oficiais de sua medicina. Seus conceitos e abordagens têm sido aperfeiçoados entre 2500-500 a.C e estão descritos no Charak Samhita e Sushrut Samhita, principais clássicos ayurvédicos em que mais de 700 plantas foram descritas com a sua classificação e propriedades terapêuticas (PATWARDHAN e KHAMBHOLJA, 2011). Diversas pesquisas têm comprovado a eficiência dessa técnica em comparação com outras metodologias utilizadas atualmente.

Até o século XIX as plantas medicinais sempre foram os maiores recursos em relação ao combate de enfermidades, além de serem uma importante fonte de nutrição humana e fonte de vitaminas (WAGNER, 2003). Já no século XX os princípios ativos provenientes dessas plantas começaram a serem isolados. (BRASIL, 2005).

O uso de plantas medicinais atualmente é observado em todo o mundo, mas é nos países em desenvolvimento que se vê uma maior utilização dessa prática (OLIVEIRA et al., 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 88% da população de países em desenvolvimento utilizam as plantas medicinais como recurso terapêuticos (CARVALHO, 2004).

Tendo em vista a crescente procura por plantas medicinais, é importante o conhecimento a respeito do conceito de fitoterápicos. Fitoterápicos são definidos como produtos derivados de plantas, usados com propósitos medicinais e para promover a saúde (BAUER, 2000). Loew e Kaszkin (2002), descrevem que

fitoterápicos são preparações com drogas vegetais que estão definidas pela nomenclatura científica botânica de acordo com o sistema binominal. Segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), fitoterápicos são medicamentos com seus princípios ativos obtidos exclusivamente de drogas vegetais.

A fitoterapia foi um dos primeiros recursos terapêuticos utilizados pelos povos, além de ser por muito tempo a única terapia disponível ao homem. Em algumas ocasiões as plantas curavam, em outras matavam ou produziam graves efeitos colaterais (MELO et al., 2009), sendo, portanto, essencial o uso responsável, racional, seguro e não abusivo das mesmas.

1.2. Metabólitos Secundários

Metabólitos secundários são definidos como compostos orgânicos produzidos por plantas que variam sua composição química de acordo com variações climáticas e geomorfológicas (MING, 1992; YAMAMOTO, 2006; METLEN et al., 2009). Existem três grandes categorias de metabólitos secundários naturais nas plantas: terpenos e os terpenóides (25.000 tipos, 55%), alcalóides (12.000 tipos, 27%), e compostos fenólicos (8000 tipos, 18%) (PINO. SANCHEZ e ROJAS, 2013)

Outros aspectos como o período em que a planta é coletada influencia no conteúdo de constituintes ativos presentes na matéria-prima vegetal (SILVA et al, 2005; BEZERRA et al. 2008). Os estágios de desenvolvimento da planta e dos seus órgãos vegetais apresentam uma importante influência na quantidade de metabólitos sintetizados pelo vegetal (TAVARES et al., 2005).

A temperatura é um dos fatores mais importantes em relação à produção de metabólitos secundários. Alguns metabólitos como os óleos essenciais são favorecidos por temperaturas mais elevadas, podendo ter sua produção aumentada. Outros possuem seus índices elevados na presença de baixas temperaturas, como no caso do ácido clorogênico e seus isômeros em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Danos acometidos a plantas provocadas por diferentes agressores como herbívoros ou patógenos, induzem a respostas bioquímicas com o objetivo de adaptarem o organismo a possíveis ataques futuros. Um mecanismo de defesa

em curto prazo apresentado pela planta é o aumento de substâncias já presentes nela, a fim de afugentar o agressor (GOBBO-NETO & LOPES, 2007)

Os metabólitos secundários têm grande importância para o homem em relação à produção de medicamentos, alimentos, entre outros (PINTO et al., 2002). Os polifenóis, por exemplo, reduzem a incidência de certos tipos de câncer, e ajudam na manutenção do colesterol sérico e na estimulação do sistema imunológico (COZZOLINO, 2009). Os flavonoides apresentam diversas aplicações farmacológicas como: antiinflamatória e antitumoral, reduzem a destruição do colágeno e a agregação plaquetária e reduzem a fragilidade capilar (ARAÚJO, 2008; FILHO et al., 2001). Já os taninos possuem atividade antioxidante, antimicrobiana, citotóxica, moluscicida e antioxidante (Manetti et al., 2010), além de sequestrarem radicais livres e complexarem macromoléculas (NIEMETZ e GROSS, 2005; SIMÕES et al., 2007). Os carotenoides possuem a capacidade de se converterem em vitamina A, sendo bastante importantes na dieta. Outra propriedade dos carotenoides é possuírem a capacidade de protegerem as células de danos oxidativos (ARAÚJO, 2008). Já os terpenos possuem diversas propriedades farmacológicas como: antitumoral, antimicrobiano, antifúngico, antiviral, anti-hiperglicêmico, analgésico, anti-inflamatório e atividades antiparasitárias (PADUCH et al., 2007).

Tendo em vista os diversos benefícios apresentados pelos metabólitos secundários podemos observar a importância que esses compostos apresentam.

1.2.1. Terpenos

Os terpenos estão entre os maiores grupos de produtos naturais, possuindo mais de 3500 substâncias conhecidas e possuem uma grande diversidade estrutural. As vantagens dessas substâncias são: baixo custo, naturalmente renováveis e boa disponibilidade. Estes compostos têm como base as unidades isoprênicas C₅ (Figura 1), sendo sintetizados por reações de condensação (OLIVEIRA, 2009).



Figura 1 Unidade isoprênica e isopreno (Fonte: Oliveira, 2009).

A classificação dos terpenos é feita de acordo com o número de unidades isoprênicas no seu esqueleto carbônico, como hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}), e tetraterpenos (C_{40}) (TAIZ & ZEIGER, 2002). Os terpenos possuem grande importância na indústria farmacêutica, sendo os mono e os sesquiterpenos os mais utilizados devido à sua alta qualidade sensorial. Diversos terpenos dão origem a substâncias sintéticas a partir de processos químicos (OLIVEIRA, 2009).

1.3. *Lippia Alba*: Descrição, propriedades farmacológicas e composição química

A espécie *L. alba* pertence à família Verbenacea, sendo que é comum, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais. Ela é amplamente distribuída pelo México, Argentina, Cuba, Brasil, Uruguai e Paraguai. Essa planta possui uma grande variedade fenotípica que a possibilita se propagar por diferentes condições ambientais (PALÁCIO-LOPÉZ; RODRIGUEZ-LOPEZ, 2007). Ela é encontrada em grandes quantidades no Sul dos Estados Unidos, mais precisamente na Flórida e em países do oriente (HENNEBELLE et al., 2008; AQUINO et al., 2010). Esta planta resiste a secas de 4 a 6 meses, isso se deve a suas alterações morfológicas (ARAMBARRI et al., 2006). A temperatura de 24°C, umidade relativa de 75% e média precipitação favorecem o crescimento desse vegetal (RUEDA et al., 2007).

A *L. alba* possui alguns quimiotipos já identificados, que apresentam diferenças quanto a sua composição química (JULIÃO et al., 2003). Análises realizadas a respeito da composição dessa planta, mostrou que ela possui grande variedade em seus constituintes, por exemplo, presença de três quimiotipos (cital, limoneno, e 1,8-cineol) em amostras do Pará, Brasil (ZOGHBI et al., 1998); limoneno como composto principal dos óleos essenciais de *L. alba* coletada na Guatemala (SENATORE et al., 2001); linalol no Uruguai (LORENZO et al., 2001)

e carvona e limoneno na Colômbia (STASHENKO et al., 2003). Na literatura os quimiotipos citral, carvona e linalol vêm sendo mostrados como majoritários (ZOGHBI et al., 1998; MAIA et al., 2001; ATTI-SERAFINI et al., 2002).

Seu desenvolvimento dá-se em solos arenosos, principalmente nas margens de rios e lagos. Trata-se de um arbusto aromático medindo até 1,5 metros de altura, com ramos finos, esbranquiçados, arqueados e quebradiços, com folhas opostas, inteiras, de bordos serrados e ápice agudo, de 3-6 cm de comprimento, flores de coloração arroxeadas reunidas em inflorescências capituliformes de eixo curto que apresentam dois diferentes tamanhos (LORENZ & MATOS, 2002).

O quimiotipo I da erva-cidreira (citral e mirceno) apresenta folhas ásperas de porte grande, além de possuir até 8 flores linguladas externas no meio de um conjunto de flores fechadas. Já no quimiotipo II (citral e limoneno) e III (carvona e limoneno), as folhas possuem tamanhos pequenos e são macias, as flores são menores em comparação ao tipo I, três a cinco flores linguladas. (MATOS, 1998).



Figura 2. *Lippia alba*: Detalhe de folhas opostas e flores róseo-arroxeadas (Fonte: JANUZZA, 2006)

A *L. alba* é conhecida popularmente como erva-cidreira-de-arbusto, do-campo ou brasileira, alecrim-do-campo ou selvagem, cidreira-brava, falsa-melissa,

cidró, cidrão, entre outros (JANNUZZI et al., 2011; SOUZA; MELLO; LOPES, 2012). As propriedades farmacológicas da *L. alba* são: analgésico/antiinflamatório/antipirético; sedativo; tratamento de diarreia e disenteria; tratamento de doenças cutâneas; desordens gastrintestinais; tratamento de doenças hepáticas; desordens menstruais; antiespasmódico; tratamento de doenças respiratórias; tratamento de sífilis e gonorreia (PASCUAL et al., 2004).

Estudos realizados no nordeste do Brasil apontam que o quimiotipo III (limonemo-carvona) apresentam ação mucolítica (MATTOS et al., 2007), já o quimiotipo II está mais associado a ação sedativa, ansiolítica e antiespasmótica. O quimiotipo I (mirceno-citral) quando utilizados como chá, apresentam propriedades calmantes e analgésica (VALE et al., 2002).

Estudos realizados na Universidade de Brasília utilizando os quimiotipos citral, citral-limoneno e carvona-limoneno, apresentaram a carvona como sendo seu constituinte majoritário (MARTINS, 2014).

1.4. Carvona

Diversos estudos têm comprovado que a carvona é o componente majoritário da *L. alba*. Stashenko (2004), demonstrou em seu estudo de comparação de diferentes métodos extrativos para a análise de metabólitos secundários voláteis de *L. alba*, cultivada na Colômbia, que a carvona estava em maior quantidade em comparação com as demais substâncias (40-57%).

A carvona é pertencente ao grupo dos monoterpenos que são uma das principais estruturas presentes nas plantas com grandes propriedades biológicas. Os monoterpenos são divididos em acíclicos, monocíclicos e bicíclicos, esses últimos ainda podem ser subdivididos em hidrocarbonetos saturados e insaturados, alcoóis, aldeídos, cetonas, lactonas e tropolonas. Diversos grupos funcionais estão presentes nesses compostos, grupos esses como os hidroxilos e carbonilos que podem estar em diferentes posições e possuírem ou não insaturações, o que pode influenciar nas atividades biológicas destes compostos (OLIVEIRA et al., 2009).

Alguns monoterpenos como limoneno, o linalol e o citronelol possuem propriedades farmacológicas definidas. Já os compostos químicos derivados

desses monoterpenos estão sendo estudados e vem demonstrando uma variedade de efeitos biológicos (GONÇALVES et al., 2010).

A carvona, de nome químico: *2-Metil-5-(1-metiletil)-2-ciclohexano-1-ona* (STEFFEN, 2007), é uma cetona cíclica, apresenta coloração amarelo pálido e odor penetrante. Sua solubilidade em água é de 79,0 ml L⁻¹ (20 °C). Ela apresenta um centro quiral permitindo que alguns vegetais possam biossintetizá-los na forma de enantiômero (R)-(-)-carvona(*d*-carvona) ou (S)-(+)-carvona(*l*-carvona) (Figura 2).

A biossíntese da carvona se dá a partir da ciclização de geranyl pirofosfato, que dá origem ao limoneno, que sofre hidroxilação dando origem à *trans*-carveol. Este, por sua vez, sofre desidrogenação e é convertido em carvona (RINGER, DAVIS e CROTEAU, 2003). De acordo com Croteau et al (2003), essa transformação requer quatro passos enzimáticos, incluindo geranyl difosfato sintase (preniltransferase), limoneno sintase (ciclização), citocromo P450 limoneno-6-hidroxilase (oxigenação) e carveol desidrogenase (transformação redox) (Figura 3).

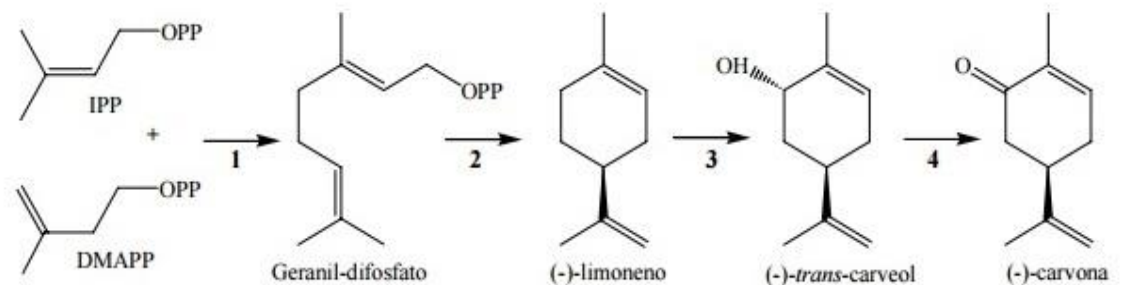


Figura 3. Rota para biossíntese de (-)-carvona a partir de precursores primários isopentenil-difosfato (IPP) e dimetil-alil-difosfato (DMAPP). Enzimas indicadas: **1.** geranyl difosfato sintase, **2.** limoneno sintase, **3.** citocromo P450 limoneno-6-hidroxilase, **4.** carveol desidrogenase (Fonte: Silva, 2005)

O enantiômero *d*-carvona é o constituinte majoritário de diversas plantas, dentre elas a *L. alba* (BIZZO et al., 2009; PORTO et al., 2010, TAVARES et al., 2005). A carvona é utilizada em fragrância de perfumes, sabões e bebidas.

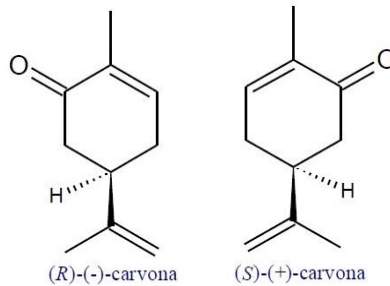


Figura 4. Estrutura enantiomérica da carvona (Fonte: Silva, 2011)

1.5. Extração

A técnica de extração tem como objetivo isolar da planta substâncias que se tem interesse. Desta maneira, existem vários tipos de extrações que levam em consideração o tipo de substância que se quer extrair (LANG E WAY, 2001).

Durante a extração de constituintes químicos de drogas vegetais observam-se alguns fenômenos como: contato da droga com o solvente, intumescendo e hidratando a droga, possibilitando dessa forma a permeabilidade das paredes celulares; ocorre a solubilização dos constituintes químicos da planta de maneira seletiva; por último ocorre a passagem dos constituintes químicos da droga vegetal solúveis por processo osmótico ou por difusão (LIST e SCHMIDT, 1989; JACQUES *et al.*, 2007). A grande variedade de constituintes químicos e suas particularidades exigem protocolos de extrações variados. A respeito do rendimento das extrações dos constituintes químicos devem ser levados em consideração o processo extrativo e os fatores que o afetam (CONTINI *et al.*, 2008). De acordo com os objetivos da extração, deve-se escolher um processo extrativo adequado (FERNANDES, NAKASHIMA E SERRA, 2004; DENNY *et al.*, 2007). Alguns fatores são importantes em relação aos processos extrativos como: grau de divisão, natureza dos solventes, volume de solvente, tempo de extração, temperatura, agitação e pH (PRISTA, ALVES e MORGADO, 1995; LIST e SCHMIDT, 1989; CHIRINOS *et al.*, 2007)

1.5.1. Fatores que influenciam a extração

O grau de divisão está diretamente associado com a estrutura histológica da planta. Se a estrutura está bem compactada, como nos caules e raízes, o solvente terá maior resistência para penetrar. Por isso, esta deve ser cortada em

pedaços menores, ao passo que folhas e flores apresentam estrutura mais delicada (SIMÕES et al., 2000).

O solvente é um dos principais componentes que influencia em uma extração. A função do solvente em uma extração é a dissolução dos constituintes químicos de interesse da planta sem que altere suas propriedades químicas e separando das demais matérias vegetais (COSTA MACHADO, 2011). Um solvente ideal atende às seguintes propriedades: seletividade, facilidade de manipulação, custos, influência no meio ambiente e segurança (COSTA MACHADO, 2011). Os solventes mais utilizados são metanol, etanol, acetona e água. O solvente que tem maior facilidade para extrair componentes fenólicos é o metanol, seguido do etanol e da água (CHIRINOS et al., 2007). Um dos fatores que influencia o rendimento da extração em relação ao solvente é a sua polaridade, podendo ser utilizada a água para o ajuste desse fator (COSTA MACHADO, 2011). A escolha do solvente é de fundamental importância para a extração, pois é essa seletividade que vai determinar a quantidade e a afinidade da substância que se quer extrair (VILEGAS, MARCHI e LANÇAS, 1997). Além da afinidade, um outro parâmetro a ser levado em consideração na hora da escolha do solvente é a sua toxicidade, considerando-se a sua utilização sem oferecer risco ao consumidor e ao meio ambiente (DIOUF, STEVONOVICA e BOUTIN, 2009). O pH é fundamental no processo de extração, pois é responsável por selecionar e determinar as substâncias a serem extraídas, de acordo com suas características químicas e de polaridade (LONGHINI et al., 2007).

O processo de agitação tem grande influência na extração dos constituintes químicos da planta. O solvente quando em contato direto com a droga vegetal alcança sua concentração de saturação dos constituintes químicos mais rápido comparado com o solvente que não está em contato com o vegetal, desta forma se a extração for mantida em repouso ela dependerá apenas do coeficiente de difusão do solvente, o qual pode ser aumentado pela agitação (PRISTA, ALVES e MORGADO, 1995; SANTOS et al., 2015).

O tempo de extração está bastante associado à capacidade do agente extrator de intumescer e hidratar a droga vegetal, solubilizar os constituintes químicos e difundir-los no meio extrator. O tempo de extração varia com a rigidez dos tecidos, estado de divisão, natureza da substância a extrair, solvente, emprego de agitação e temperatura. Fatores como temperatura, ausência ou

presença de agitação, assim como a velocidade da agitação podem ser influentes no tempo de extração (PRISTA, ALVES e MORGADO, 1995).

A temperatura é um fator muito importante em relação à extração. O aumento da mesma facilita a extração de substâncias químicas da planta, pois em geral aumenta a solubilidade. Porém, constituintes químicos termosensíveis podem apresentar modificações em suas estruturas. (PRISTA, ALVES e MORGADO, 1995).

Além dos aspectos descritos, é importante avaliar toxicidade do solvente, bem como disponibilidade, custo e adequação tecnológica do processo extrativo.

Tendo em vista a influência de diversos fatores na obtenção de extratos decorrentes de plantas, buscou-se na literatura técnicas utilizadas na sua obtenção. Foram selecionados os seguintes métodos de extrações: preparação ayurvédica– hima (maceração), decocção, infusão e a extração por Soxhlet.

1.5.2. Hima (Infusão a frio)

Hima é um tipo de maceração, onde a extração da droga vegetal é feita em temperatura ambiente por um período prolongado utilizando-se um recipiente fechado. Pode também ser classificada como uma infusão a frio. Por meio dessa técnica não se tem o esgotamento da matéria prima devido a saturação do solvente ou um equilíbrio difusal entre as substâncias envolvidas (SIMÕES et al., 2000). Esse método é utilizado quando as substâncias de interesse são solúveis a temperatura ambiente em um solvente não volátil (MIRANDA, CUELLAR, 2001).

1.5.3. Extração por Soxhlet

A extração por Soxhlet, desenvolvido em 1879, tem sido a técnica de extração mais utilizada para o isolamento de substâncias em sólidos (CASTRO, PRIEGO-CAPOTE, 2010).

Baseia-se na introdução de solvente constantemente no reservatório onde se encontra o material vegetal, com o volume determinado pela capacidade do extrator. O processo de sifonação permite que o volume de solvente juntamente com o material extraído seja retirado do reservatório. Através de um processo de gotejamento o solvente é novamente inserido no recipiente contendo o vegetal. Esse mecanismo é repetido constantemente, permitindo assim a troca de solvente

e mantendo a extração contínua. A vantagem desse procedimento é a baixa quantidade de solvente utilizado devido a sua capacidade de renovação através da condensação de seus vapores (SIMÕES et al., 2000). Entretanto, as altas temperaturas podem prejudicar substâncias termolábeis (ARAGÃO, 2002).

1.5.4. Infusão

A infusão consiste na redução da droga vegetal, para que dessa maneira possa ser penetrada e as substâncias de interesse sejam extraídas com maior facilidade pela água (SIMÕES et al., 2000). A vantagem dessa técnica é a sua facilidade de realização. Sua principal desvantagem é devido a extração do principio ativo ser parcial. As partes vegetais recomendadas para serem utilizadas por essa técnica são folhas, flores e ramos finos (BOTSARIS, 2006).

1.5.5. Decocção

A decocção é o método extrativo realizado por meio do aquecimento da droga juntamente com o solvente (água), mantendo uma fervura por um certo período de tempo, ao fim a mistura é resfriada e filtrada (SIMÕES et al., 2000). A água em ebulição pode levar à degradação dos princípios ativos contidos na planta. A vantagem da técnica é em relação ao aproveitamento do vegetal (BOTSARIS, 2006).

1.6. Metodologia para quantificação dos componentes majoritários do extrato vegetal: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Dentre as metodologias utilizadas para a quantificação de substâncias químicas, as técnicas cromatográficas se destacam. No meio de todas elas a CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) é uma das mais utilizadas em laboratórios de pesquisa e de controle da qualidade (GIL, 2010).

A CLAE em fase reversa é uma das técnicas mais utilizadas nos laboratórios mundiais (MAJORS et al., 1997). Esse sistema é composto por uma fase estacionária de menor polaridade e uma fase móvel de maior polaridade, sendo que sua fase normal apresenta polaridade invertida. Estas fases apresentam várias vantagens, tais como: uso de fases móveis menos tóxicas e de

menor custo, como metanol e água; fases estacionárias estáveis de muitos tipos diferentes; rápido equilíbrio da coluna após a mudança da fase móvel; facilidade de empregar eluição por gradiente; maior rapidez em análises e boa reprodutibilidade dos tempos de retenção. Além disso, são muito aplicadas à separação de solutos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades químicas (TONHI et al., 2002).

1.7. Validação do método analítico

O objetivo da validação de um procedimento analítico é confirmar sua adequação em relação ao fim a que se destina. O fundamento do procedimento analítico deve ser claramente entendido, pois é a partir dele que os demais parâmetros serão analisados, tais como: linearidade, exatidão, repetibilidade, precisão intermediária, especificidade, limite de detecção e limite de quantificação (ICH, 2005).

1.7.1. Especificidade

Consiste na capacidade do método de avaliar de uma maneira confiável uma determinada substância presente em uma mistura complexa. Sua determinação é feita através do exame do padrão de referência, na presença de contaminantes que interfiram na sua determinação, ou ainda, através da determinação solução-padrão e amostra (GIL, 2010).

O resultado da especificidade é feito pela comparação dos valores oriundos da solução-padrão e amostra, ou entre solução-padrão com e sem interferentes. (GIL, 2010).

1.7.2. Linearidade

A linearidade é a capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro dos limites de variação desejados (RIBANI et al., 2004).

Para se obter a linearidade de um método analítico são necessários no mínimo cinco pontos em uma reta analítica. Depois da verificação dos dados, são

obtidos seus respectivos gráficos e calculada a equação da reta ($y = ax + b$) além de outros parâmetros, como a intersecção em $y(a)$, inclinação (b) e coeficiente de correlação (R).

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser obtida pelo método da regressão linear. Enquanto os coeficientes (a) e (b) nos fornecem indicação dos limites mínimos e sensibilidade, o coeficiente de correlação (R) permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, indicando dispersão do conjunto de dados analíticos e a incerteza das medições experimentais (GIL, 2010).

Estatisticamente, o coeficiente (b) deve ser diferente de zero, sendo que quanto mais próximo de zero, menor a sensibilidade do método. Já o coeficiente (a), quanto mais próximo de zero melhor, pois maior será o ajuste da medida. Além dos coeficientes de regressão a e b , é possível se calcular o coeficiente de correlação R . Onde, quanto mais próximos de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI et al., 2004). A ANVISA recomenda coeficiente maior ou igual a 0,99 e o Inmetro, valor acima de 0,90.

1.7.3. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção é a mais baixa concentração detectável pelo método, já o limite de quantificação é a menor concentração que pode ser determinada quantitativamente por determinado método. Os limites podem ser determinados por cálculos segundo as equações a seguir (INMETRO, 2003; RIBANI et al., 2004).

$$LD = \frac{3,3DPa}{IC}$$

Equação 1

$$LQ = \frac{10DPa}{IC}$$

Equação 2

Onde:

LD = limite de detecção;

LQ = limite de quantificação;

DPa = desvio padrão do intercepto com eixo y (coeficiente linear) de no mínimo três curvas;

IC = média da inclinação da curva de calibração (coeficiente angular).

1.7.4. Exatidão

A exatidão de um método condiz com o quanto os resultados mensurados por ele estão de acordo com os valores teóricos. Para se avaliar esse método devem-se utilizar concentrações conhecidas de um padrão de referência (GIL, 2010). A ANVISA recomenda que a exatidão seja fornecida como a razão do valor predito e o valor considerado verdadeiro.

1.7.5. Precisão

A precisão é o quanto o método tem a capacidade de repetibilidade e reprodutividade tanto em valores obtidos de análises individuais quanto os dados significativos de uma análise que podem ser utilizados como resultados (GIL, 2010). Além disso, outro elemento está associado à precisão: precisão intermediária (CAUSON, 1997; HUBERT, 1999)

1.7.5.1. Precisão intermediária

A precisão intermediária expressa a variação na amostra que pode ocorrer no mesmo laboratório, que influencia nas análises. Pode ser realizada em diferentes dias, diferentes analistas, diferentes equipamentos, entre outros (Gil, 2010).

1.7.5.2. Repetibilidade

A repetibilidade é a capacidade do método de atingir a máxima diferença aceitável em análises individuais sequenciais quando se tem as mesmas condições (GIL, 2010). A repetibilidade deve ser avaliada usando um mínimo de

nove determinações que cubra o intervalo linear do método ou um mínimo de 6 determinações para 100% da concentração do teste (ICH, 2005)

2. JUSTIFICATIVA

Há muitos anos a humanidade tem buscado conhecimentos a respeito da utilização das plantas medicinais (SOUZA; RIBEIRO, 2008).

Diversas plantas conhecidas apresentam em sua composição moléculas com atividade biológica comprovada e que podem servir de modelo para o desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Com o desenvolvimento da tecnologia, a humanidade tem buscado desvendar e validar cientificamente espécies vegetais com potencial clínico (GURIB-FAKIM, 2006).

Tendo em vista o estudo realizado recentemente na Universidade de Brasília com o título “Efeitos da *Lippia alba* sobre o comportamento de animais submetidos ao modelo do labirinto em T elevado” (MARTINS, 2014) cujos resultados promissores encontrados em animais indicam o uso do extrato aquoso dessa planta em futuros estudos para o tratamento da ansiedade, o presente trabalho tem por objetivo responder o questionamento levantado a respeito de qual o seria melhor método de extração dessa espécie.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral: Analisar a composição dos extratos de *Lippia alba* a partir de diferentes métodos de extração.

Objetivos Específicos:

- Caracterizar a matéria-prima vegetal.
 - Obter extratos de quatro diferentes métodos de extração: Extração por Soxhlet, decocção, extração como infuso e hima (infusão a frio).
 - Quantificar o teor dos componentes majoritários nos extratos obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência.
 - Determinar o melhor método de extração.
-

4. METODOLOGIA

4.1. Material

As folhas de *L. alba* utilizadas nesse trabalho foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares da Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasília – DF.

O padrão primário da carvona foi obtido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O solvente metanol com grau cromatográfico foi obtido da J. T. Baker (Cidade de México, México). O extrato foi preparado com água destilada. Todas as análises foram realizadas com água ultrapura Milli-Q (Millipore, Illkirch-Graffenstaden, França).

4.2. Métodos

4.2.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima do padrão

Para a determinação do comprimento de onda de absorção máxima para o marcador, a carvona foi solubilizada em metanol e foi realizada uma varredura dessa solução em um espectrofotômetro de UV/Vis (Shimadzu, UV 1800), utilizando-se cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico. O comprimento de onda de máxima absorção no UV/Vis foi selecionado para análise da carvona em CLAE.

4.2.2. Método analítico para quantificação do fármaco

As análises cromatográficas de quantificação da carvona foram efetuadas em cromatógrafo LC-20AD Shimadzu, equipado com detector UV-Vis operando a 236 nm. A separação foi realizada em coluna C18 de fase reversa 150 x 4,6 mm x 5 µm. A fase móvel foi constituída por metanol e água acidificada (50:50 v/v) com vazão de 1,2 mL/min e volume de injeção de 20 µL.

A metodologia analítica utilizada para a quantificação da carvona foi validada, avaliando-se os parâmetros analíticos de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

4.2.3. Validação do método analítico

4.2.3.1 Especificidade

A especificidade foi determinada através da análise do cromatograma do padrão de carvona, comparado com o cromatograma do extrato de *L. alba* para verificar possíveis interferentes no tempo de retenção do marcador. Além disso, a amostras do extrato foram adicionadas soluções de carvona, nas concentrações de 0,25; 0,50; 2,50; 5,00; 7,00; 10,00 e 12,50 µg/mL e analisadas por CLAE.

4.2.3.2. Linearidade

A linearidade foi determinada com auxílio da equação da reta, obtida através do cálculo das áreas em diferentes concentrações da amostra: (0,25; 0,50; 2,50; 5,00; 7,00; 10,00 e 12,50 µg/mL utilizando MeOH como solvente). Foi calculada a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e obtido o seu coeficiente de correlação linear (R).

4.2.3.3. Precisão

4.2.3.3.1. Repetibilidade

A repetibilidade foi determinada analisando-se 3 concentrações, com 5 repetições cada uma. A aceitação é estabelecida pela proximidade dos resultados das repetições, com coeficiente de variação inferior a 5 %.

4.2.3.3.2. Precisão intermediária

Para a avaliação da precisão do método foi determinada a precisão intermediária calculando-se o coeficiente de variação entre as áreas dos picos de uma seqüência de concentrações da amostra preparadas sob as mesmas condições experimentais em três dias diferentes. Cada procedimento foi realizado em quintuplicata. A aceitação é estabelecida pela proximidade dos resultados mediante a variação de dias.

4.2.3.4. Exatidão

A exatidão foi obtida seguindo as recomendações da ICH, que estabelece um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração. A aceitação é estabelecida pela proximidade do valor encontrado de 100%.

4.2.3.5. Limites de detecção e quantificação

A partir de cinco curvas de calibração foram calculadas as equações da reta para cada uma e o coeficiente angular e linear foram determinados. Posteriormente foi calculada a média e o desvio padrão para logo depois ser determinado o LD e o LQ teóricos de acordo com as equações 1 e 2.

Após determinação teórica, foram injetadas amostras do padrão nas concentrações calculadas e em valores próximos.

4.2.3.6. Coleta da *Lippia alba*

As partes aéreas da *L. alba* foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares da Universidade de Brasília - Faculdade de Ceilândia (UnB-FCE). A planta foi colhida pela manhã (JANNUZZI et al., 2010) durante o seu crescimento vegetativo (TAVARES et al., 2005). Foram coletadas cerca de 100 g de folhas.



Figura 5. *Lippia alba* – Horto de plantas medicinais, aromáticas e condimentares da Faculdade de Ceilândia - UnB.

4.2.4. Caracterização da *Lippia alba* e obtenção da droga vegetal

4.2.4.1. Características organolépticas

Foram observadas as características perceptíveis pelos órgãos do sentido segundo a Farmacopéia Brasileira V edição, uma vez que alteração das características organolépticas pode indicar a ocorrência de degradação enzimática ou oxidação do material, entre outros processos (BRASIL, 2010). Foram avaliados o odor, sabor e aspectos macroscópicos das folhas.

4.2.4.2. Materiais estranhos

A amostra da planta foi espalhada sobre uma superfície plana, homogeneamente, separando-as em quatro partes (quarteamento). Com o auxílio de uma pinça, o material estranho foi separado da droga a olho nu. Posteriormente, foi utilizada uma lente de aumento (5 a 10 vezes) para fazer a separação. O material estranho foi então pesado e sua porcentagem foi determinada com base na sua massa (BRASIL, 2010).

4.2.4.3. Obtenção da droga vegetal

Após análise de material estranho, a *L. alba*, foi seca em estufa com circulação de ar, a uma temperatura de 40°C, por 3 dias. Após secagem, a droga vegetal foi pulverizada para caracterização e preparo dos extratos.

4.2.4.4. Determinação de água

Foram transferidos cerca de 2 a 5 g exatamente pesados, de droga vegetal preparada conforme instruções anteriores, para pesa-filtro tarado, previamente dessecado nas mesmas condições a serem adotadas para a amostra, durante 30 minutos. A amostra foi dessecada a 100-105°C durante 5 horas, até massa constante. Foi calculada a porcentagem de água (BRASIL, 2010). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.4.5. Cinzas totais

Foram pesados exatamente, cerca de 2,5 g da amostra, que foram transferidos para os cadinhos previamente dessecados e tarados. Em seguida a droga vegetal foi incinerada a 200°C por 30 minutos, 400°C por 60 minutos e 600° por 90 minutos. Após resfriamento em um dessecador, a amostra final foi pesada e a porcentagem de cinzas foi calculada (BRASIL, 2010). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.5. Obenção dos extratos

4.2.5.1. Extração por Soxhlet

Aproximadamente 5g do material seco foram colocados no extrator de Soxhlet, sendo a amostra compactada entre camadas de algodão. O extrator foi encaixado a um balão volumétrico contendo 500 mL de água destilada e acoplou-se a ele um condensador de bolas, conectado a um sistema contínuo de resfriamento. O sistema foi mantido sobre manta aquecedora durante todo o processo de extração, o qual teve duração de aproximadamente 5 horas (MARTINS, 2014). O esquema do equipamento e procedimento de extração é ilustrado na Figura 4. O procedimento foi realizado em triplicata.



Figura 6. Sistema de extração por Soxhlet

4.2.5.2. Hima (Maceração)

A amostra foi seca e totalmente pulverizada. A preparação foi realizada adicionando-se água na amostra pulverizada na razão de droga vegetal:solvente de 2:16. Após 24 horas foi realizada uma filtração e a torta foi espremida para uma maior obtenção da amostra. Logo em seguida, o filtrado foi utilizado (EMEA, 2007; KATIYAR, 2008). O procedimento foi realizado em triplicata.

4.2.5.3. Infusão

A preparação foi realizada em um béquer onde foi vertido água fervente sobre a droga vegetal em uma proporção de droga vegetal: solvente de 1:20. Em seguida o recipiente foi tampado e mantido desta forma por 15 min (EMEA, 2007). O procedimento foi realizado em triplicata.

4.2.5.4. Extração por decocção

A preparação foi realizada em um recipiente na razão droga vegetal: solvente 1:20, onde 1 g da amostra foi fervida juntamente com 20 mL de água e tampada. Logo após o começo da fervura foram marcados 15 minutos. Em seguida o preparado foi filtrado e colocado em um recipiente para ser utilizado posteriormente (EMEA, 2007). O procedimento foi realizado em triplicata.

4.2.6. Liofilização

Para que a quantificação da carvona fosse possível, os extratos deveriam estar solubilizados no mesmo solvente que o padrão, que é solúvel em metanol, mas pouco solúvel em água. Assim, os extratos aquosos foram liofilizados para posterior ressuspensão em metanol, e dessa forma serem quantificados por cromatografia.

O processo de secagem por liofilização envolve a eliminação da água da amostra após seu prévio congelamento, baseando-se no fenômeno da sublimação, ou seja, a mudança do estado físico de sólido para vapor, sem a passagem pelo estado líquido. Foram tomados 5 mL de cada amostra e

liofilizadas, para posterior ressuspensão em metanol. Dessa forma, o material previamente congelado foi submetido a vácuo elevado e aquecimento pelo equipamento, de modo que a água congelada sublimasse, restando apenas os sólidos secos da solução original. Assim, no procedimento, foi empregado o liofilizador LIOTOP modelo K202, sendo o congelamento realizado à -90°C e pressão média de aproximadamente 130 micrômetros de mercúrio (μHg) por 24 horas.

4.2.7. Preparação das amostras para análise por CLAE

As amostras previamente liofilizadas foram solubilizadas em 5 mL de metanol, filtradas e injetadas no cromatógrafo para análise segundo critérios especificados na sessão 4.2.6.

5. Resultados

5.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima do padrão

O pico de absorção máxima da carvona solubilizada em metanol ocorreu em 236 nm e esse comprimento de onda foi selecionado para análise em CLAE.

5.2. Validação do Método

5.2.1. Especificidade

A especificidade do método foi comprovada, visto que nenhum interferente eluiu no tempo de retenção da substância de interesse, e se apresentou bem separada dos demais compostos presentes na amostra (Figura 5 e 6) com um tempo de retenção de 10,21 min.

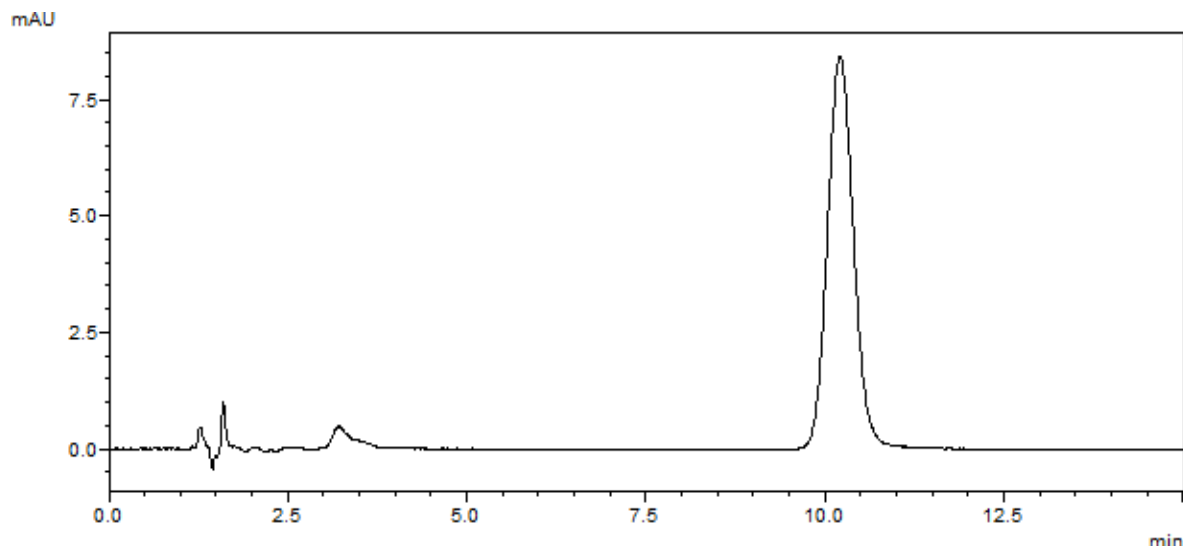


Figura 7. Perfil cromatográfico do padrão carvona. Cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 236 nm) com tempo de retenção de 10,21 minutos. Solvente metanol. Condições cromatográficas do método: coluna C18 de fase reversa: 15 cm x 4,6 mm x 5 µg/mL; fase móvel MeOH:H₂O acidificada; temperatura 30° C; vazão 1,2 mL/min; volume de injeção de 20 µL

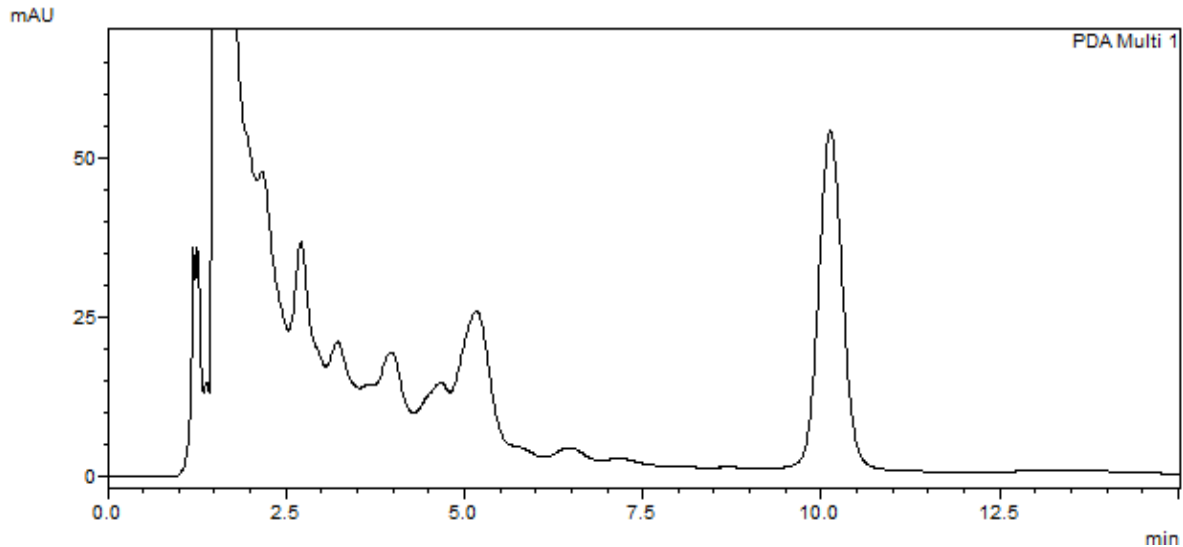


Figura 8. Perfil cromatográfico do extrato de *L. alba*. Cromatograma obtido por CLAE UV-Vis (detecção a 236 nm), com tempo de retenção de 10,21 minutos. Solvente metanol. Condições cromatográficas do método: coluna C18 de fase reversa: 15 cm x 4,6 mm x 5 µg/mL; fase móvel MeOH:H₂O acidificada; temperatura 30° C; vazão 1,2 mL/min; volume de injeção de 20 µL

Além disso, após a adição do padrão sobre a matriz, foi construída uma curva de calibração e comparada com a curva de linearidade. As duas curvas analíticas foram paralelas, demonstrando dessa forma que o método é seletivo para a substância analisada.

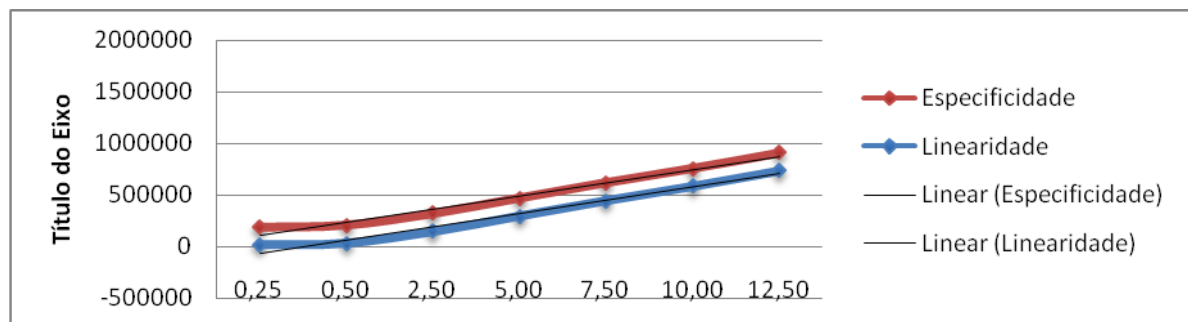


Figura 9. Curva de calibração e linearidade.

5.2.2. Linearidade

A linearidade da curva analítica na faixa de 0,25 a 12,5 µg/mL foi obtida a partir do ajuste de regressão linear ($R^2 = 0,99995$). Segundo o ICH, o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,99. Sendo assim, o valor de R^2 obtido na análise da carvona pelo método CLAE-UV-Vis desenvolvido obedece aos limites estabelecidos (Figura 7).

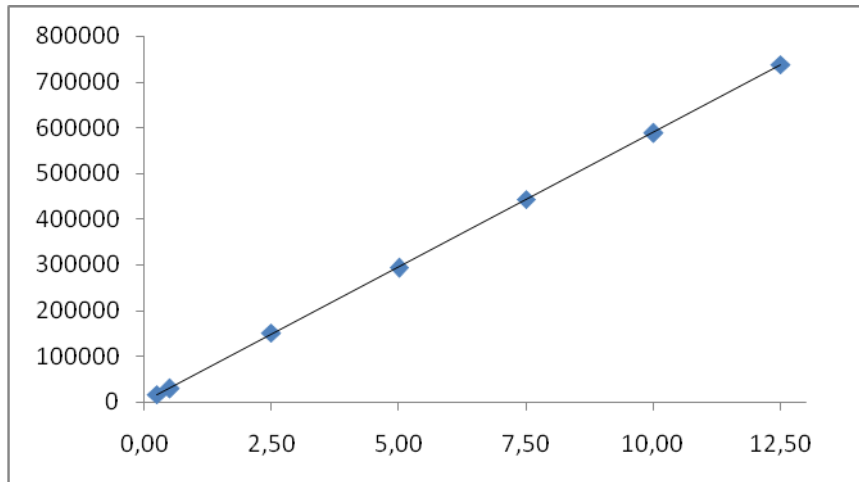


Figura 10. Gráfico de linearidade obtido a partir das concentrações 0,25; 0,50; 2,50; 5,00; 7,00; 10,00 e 12,50 µg/mL do padrão da carvona. $R^2= 0,999$

5.2.3. Precisão

Os resultados referentes à avaliação da precisão intermediária para a carvona estão demonstrados na Tabela 1. O ICH recomenda que o coeficiente de variação (CV%) não exceda 5%. Assim, os valores encontrados atendem aos limites estabelecidos.

Tabela 1– Precisão intermediária do padrão carvona.

Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Mensurada (µg/m)*	Precisão (CV %)	Exatidão (%)
0,3	0,25	2,85	99,55
5,0	5,07	0,67	101,0
10,0	9,92	0,61	99,19

*n = 3

5.2.4. Exatidão

Os valores obtidos comprovaram a exatidão do método, onde os resultados se mostraram próximos de 100%.

5.2.5. LD e LQ

Os resultados para o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) teóricos foram obtidos pelo cálculo baseado nas equações 1 e 2 foram

respectivamente 0,04 µg/mL e 0,13 µg/mL. A partir desses resultados, foram feitas análises práticas para comprovação desses valores que estão representados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de LD e LQ reais.

Concentr. Teórica(µg/mL)	Concentr. Mensurada* (µg/mL)	Precisão (CV %)	Exatidão (%)
0,03	-	-	-
0,04	0,032	5,39	80,46
0,05	0,039	13,05	78,09
0,12	0,106	6,08	88,51
0,13	0,131	0,50	100,91
0,14	0,138	2,30	98,66

*n = 5

Os resultados obtidos demonstram que os valores mensurados estão de acordo com o valores calculados.

5.3. Caracterização da *Lippia alba*

5.3.1. Características Organolépticas

Foram detectadas as seguintes características organolépticas da folha de *L. alba*: odor forte, sabor agradável e ligeiramente amargo, um pouco adstringente, folhas opostas, medindo 5,0 - 7,0 cm de comprimento, curtamente pecioladas, limbo oval, base cuneada e decorrente, ápice agudo, margem serrilhada, nervação peninérvea, consistência membranácea, superfície pubescente e pecíolo lateral.



Figura 11. Características macroscópicas da folha de *Lippia alba*

As características organolépticas estavam de acordo com os parâmetros pré-estabelecidos e a planta foi aprovada nesse teste.

5.3.2. Materiais estranhos

Os materiais estranhos à droga foram retirados e pesados. O valor encontrado foi de 1,8 g e a massa inicial da amostra era de 100,3 g. A porcentagem encontrada foi de 1,79% de materiais estranhos presentes na amostra. Tendo em vista que a Farmacopéia Brasileira V edição determina que a quantidade de materiais estranhos encontrados após o quarteamento deve ser inferior a 2% m/m, a amostra em questão está de acordo.

5.3.3. Determinação de água

Os valores preconizados pela Farmacopéia Brasileira IV para drogas vegetais estão na faixa de 6% e 16% de umidade, em métodos gravimétrico, azeotrópico ou volumétrico.

Os valores encontrados estão demonstrados na tabela 3.

Tabela 3 - Determinação de água da *L. alba*.

Amostras	Massa inicial (g)	Massa final (g)	Porcentagem (%)
P1	2,0723	1,9566	5,58
P2	2,0907	1,9091	8,68
P3	2,0804	1,9990	8,14
Média	2,0811	1,9576	7,46

O valor de 7,46% encontrado na amostra está de acordo com os padrões estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira IV.

A determinação de água é de fundamental importância na conservação de extratos vegetais. A quantidade de água inadequada pode favorecer o desenvolvimento de diversos microrganismos, além de favorecer a deteriorização

e a hidrólise dos princípios ativos (GIL, 2010).

5.3.4. Cinzas totais

O teor de cinzas além do estabelecido pela Farmacopéia é indicativo da presença de materiais inorgânicos como areia, terra ou pedras. Podem ser responsáveis pela adulteração do material.

O teor de cinzas totais obtido para as folhas secas de *L. alba* foi de 11,18% (Tabela 4), valor este que está dentro do limite de 14,00% estabelecido pela Farmacopéia V edição.

Tabela 4 - Determinação de cinzas totais *L. alba*.

Amostras	Massa do cadinho vazio (g)	Massa do cadinho + droga vegetal (g)	Massa do cadinho +cinzas	Porcentagem (%)
P1	43,18	45,70	43,47	11,50
P2	39,58	42,11	39,86	11,06
P3	40,44	42,99	40,72	10,98
Média	41,06	43,60	41,35	11,18

5.4. Rendimentos

A partir de 100,000 g do material colhido, foram obtidos 38,446 g após a secagem.

O método de extração utilizando soxhlet chegou à obtenção de 340 mL de extrato, correspondendo a 68 % de rendimento. A infusão chegou a 14 mL (70 %). A extração por decocção teve o máximo de 11 mL de rendimento (55 %). Já a Hima apresentou os menores rendimentos, alcançando apenas 8 mL (40 %).

5.5. Quantificação da carvona nos extratos

O objetivo do presente trabalho foi analisar a composição dos extratos de *L. alba* a partir de diferentes métodos de extração afim de determinar qual apresentaria a melhor concentração de carvona na planta.

Para as análises quantitativas foi utilizada a CLAE, com metodologia validada para análise da carvona em extratos de *L. alba* (item 5.2.). Comparando-se os métodos de extração, o método por decocção mostrou-se o mais eficiente (Figura 9).

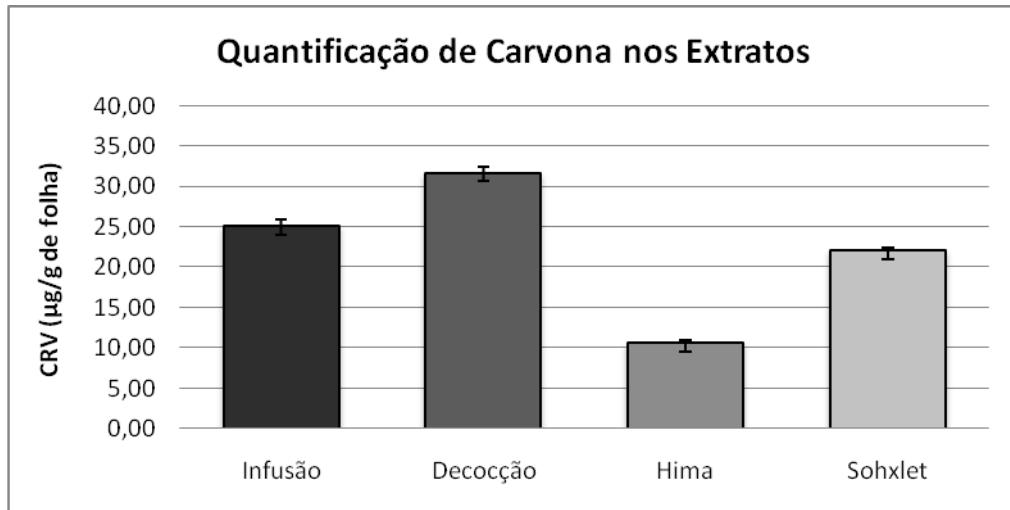


Figura 12. Quantificação da carvona nos extratos de *Lippia alba*: infusão, decocção, hima e soxhlet. CRV=carvona

O resultado encontrado na hima (infusão a frio) já era esperado, pois a metodologia da extração a frio desfavorece o aumento da taxa de extração (CACACE e MAZZA, 2002). Bucar et al. (2013) relata que técnicas de maceração com o objetivo de extração de produtos naturais têm baixo rendimento.

Ao utilizar temperaturas elevadas, observamos que as extrações a quente apresentaram maiores teores de carvona. Entre elas, a extração por Soxhlet apresentou menor eficiência. Resultado semelhante foi encontrado por Machado, Nascimento e Rosa (2015), no trabalho intitulado “Estudo da extração de óleo essencial e de compostos bioativos das folhas de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*)”, onde observaram que a extração com Soxhlet utilizando água foi menor em comparação aos valores encontrados na infusão. Podemos associar o resultado inferior da extração por Soxhlet em comparação ao da decocção e à infusão ao seu processo, pois o método exige o contato do material vegetal com altas temperaturas por tempo bastante longo, o que não é adequado para compostos termolábeis, pois ocorre degradação durante a extração (STASHENKO, JARAMILLO, MARTÍNEZ, 2003; MOURA et al., 2012).

Já em relação ao valor encontrado na infusão observa-se que foi um pouco

inferior à decocção, mas as concentrações alcançadas foram próximas. Resultado semelhante foi encontrado por Witkowska-Banaszczaka et al (2005), estudando atividade antimicrobiana na erva viola tricolor. Souza et al. (2008) observaram em seus estudos com infusões de partes áreas de *Vernonia polyanthes*, *Elvira biflora* e *Apium leptophyllum*, a obtenção de terpenos pelo método de infusão.

O maior valor obtido na extração por decocção pode estar relacionado com a ocorrência dos monoterpenos nos vegetais. Estes produtos são secretados pelos tricomas glandulares e pelas células do parênquima clorofiliano (RICCIARDI et al., 1999). Estas estruturas estão bastante protegidas no vegetal (IRUTHAYATHAS & HERATH, 1982). Devido a isso, um aumento da temperatura favorece serem degradados e liberarem o seu material. Entretanto, o tempo de extração deve ser reduzido para que não haja degradação dos compostos termolábeis. Com isso, o aumento da temperatura em um período mais reduzido contribuiu para a extração mais eficaz da substância (SOARES et al., 1998). Resultado semelhante foi encontrado por Seeling e Grazziotin (2014), onde observaram que na decocção, o vegetal permanece mais tempo em contato com o solvente extrator, assim como a temperatura, influenciando de maneira positiva, aumentando assim a solubilidade da substância de interesse.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi realizada uma pesquisa bibliográfica abordando as principais aplicações farmacológicas da *L. alba* e os principais interferentes nas formas de extração. A extração por decocção constitui uma técnica promissora para aplicação em processos de extração da *L. alba*, uma vez que proporcionou a obtenção de extratos de com uma maior concentração de carvona a partir de um solvente não tóxico, em um tempo curto e com baixo custo.

Ao final deste trabalho foi possível compreender como as variáveis dos processos, temperatura e tempo, podem influenciar na composição do composto carvona em extratos da erva-cidreira, o que demonstra que a técnica escolhida tem uma importante vantagem, por alcançar maiores teores de carvona, com uma metodologia simples, econômica e acessível, o que poderá possibilitar o seu emprego em diversas frentes terapêuticas.

7. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678-689, 2006.

AQUINO, L.C.L.; SANTOS, G.G.; TRINDADE, R.C.; ALVES, J.A.B.; SANTOS, P.O.; ALVES, P.B.; BALNK, A.F.; CARVALHO, L.M. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de erva-cidreira e manjeriço frente a bactérias de carnes bovinas. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.21, n.4, p. 29-535, 2010.

ARAMBARRI, A.; FREIRE, S.; COLARES, M.; BAYOUN, N.; NOVOA, M.; MONTI, C.; STENGLEIN, S. Leaf anatomy of medicinal shrubs and tree from gallery Forest of the paranaense province (Argentina) Part 1. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v.41, n.3-4, p.233-268, 2006.

ARAÚJO, J. M. (2008), **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 4. Ed. Viçosa: Editora UFV, 477p.

ATTI-SERAFINI, L.; PANSERA, M. R.; ARRI-SANTOS, A. C.; ROSSATO, M.; PAULETTI, G. F.; ROTA, L. D.; PAROUL, N.; MOYNA, P. (2002). **Rev. Bras. Plantas Mediciniais**. 4: 72-74.

BAUER, B. A. Herbal therapy: what a clinician needs to know to counsel patients effectively. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 75, n. 8, p. 835 – 841, 2000.

BEZERRA AME; MEDEIROS-FILHO S; OLIVEIRA, LDM; SILVEIRA ER. Produção e composição química da macela em função da época de colheita. **Horticultura Brasileira**, v.26, p. 26-29.2008.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A.M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil aspectos gerais, desenvolvimeto e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BRASIL, ANVISA. RDC nº 10, de 09 de março de 2010: Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares-PMNPC**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 546 p.

BRASIL. Regulamento técnico para produtos para o preparo de infusão e decocção. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Consulta pública nº 83**, de 13 de Dezembro de 2004. Disponível em www.anvisa.gov.br Acesso em: 06 de junho 2015.

-
- BOTSARIS, A.S. **Fórmulas Mágicas**: Nova Era, 4. ed. Rio de Janeiro, 2006. 784p.
- BUCAR, F.; WUBE, A. & SCHMID, M., Natural product isolation: how to get from biological material to pure compounds. **Nat. Prod. Rep**, v. 30, p. 525-545, 2013.
- CACACE, J. E.; MAZZA, G. **Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Black Currants with Sulfured Water**. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 5939-5946, 2002/10/01 2002. ISSN 0021-8561 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/jf025614>. Acesso em 1 de junho de 2015.
- CARTER, O. A.; PETERS, R. J. & CROTEAU, R.. Monoterpene biosynthesis pathway construction in *Escherichia coli*, **Phytochemistry**, v. 64, p. 425–433, 2003.
- CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios**: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. São Paulo: Tecmed; 2004.
- CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R., **Contribuição ao estudo das plantas medicinais metabólitos secundários**. 2. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, p.99, 2004.
- CASTRO, M.; PRIEGO-CAPOTE, F. J. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography**, v. 1217, p. 2383-2389, 2010.
- CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis; viewpoint and discution. **J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v. 689, n.1, p.175-180, 1997.
- CHIRINOS, R.; ROGEZ, H.; CAMPOSA, D.; PEDRESCHI, R. e LARONDELLE, Y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. **Separation and Purification Technology**, v.55, p. 217-225, 2007.
- CONTINI, M.; BACCELLONI, S.; MASSANTINI, R. e ANELLI, G. Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. **Food chemistry**, v. 110, p 659-669, 2008.
- COSTA MACHADO, A. R. M. **Obtenção de produtos a partir das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.: otimização da extração e secagem em spray dryer utilizando planejamentos experimentais**. Dissertação (de Mestrado)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, Ribeirão Preto, São Paulo. 2011.
- COZZOLINO, S. M. F. (2009), **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 3. Ed. São Paulo: Manole, 1200p.
- DENNY, C.; ZACHARIAS, M. E.; KOHN, L. K.; FOGLIO, M. A. e CARVALHO, J. E. Atividade antiproliferativa dos extratos e da fração orgânica obtidos das folhas de *Virola sebifera* Aubl. (Myristicaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 598, 2007.
-

DIOUF, P. N.; STEVANOVICA, T.; BOUTIN, Y. The effect of extraction process on polyphenol content, triterpene composition and bioactivity of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 297-303, 2009.

ELDIN S.; DUNFORD, A. **Fitoterapia na atenção primária à saúde**. São Paulo: Manole; 2001.

EMA, European Medicines Agency, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), 2007. **Community herbal monograph on *Thymus vulgaris* L. and *Thymus zygis* L., herba**, final document of 31 October 2007, Doc. Ref. EMA/HMPC/ 234113/2006.

FARMACOPEIA brasileira. 4 ed. Atheneu: São Paulo, 1988.

FERNANDES, C. A. D; NAKASHIMA, T. e SERRA, G. E. Novas contribuições ao estudo da galactomanana bruta extraída de sementes de *Senna spectabilis* DC. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, p. 353-358, 2004.

FILHO, D. W.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. (2001), Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: Yunes, R. A. e Calixto, J. B. **Plantas Mediciniais**: sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Agros, 317-334.

GIL E. S.; ORLANDO, R. M.; SERRANO, S. H. P.; FISCHER, D. C. H.; NACHADO, S. A. S.; MATIAS, R.; BARA, M. T. F.; FIGUEIREDO, G.; BARBOSA, W. G.; SILVEIRA, D.; MONTALVÃO, E. V. **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. 3. ed. São Paulo - SP: Pharmabooks, 2010. v. 1. 511p.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-81, 2007.

GONÇALVES, J. C. R.; ALVES, A. M. H.; ARAÚJO, A. E. V.; CRUZ, J. S.; ARAÚJO, D. A. M. Distinct effects of carvone analogues on the isolated nerve of rats, **European Journal of Pharmacology** 645 (2010) 108–112.

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

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

HUBERT, P. et al. The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. **Anal. Chim. Acta**, v. 391, p.135-139, 1999.

ICH - **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use**: Validation of Analytical Procedures, Text and Methodology Q2 (R1), 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**, DOQCGCRE-008, 2003, 36p.

IRUTHAYATHAS, E.; HERATH, W. H. M. Micro-hairs of citronella leaves and their relationship to components of citronella oil. **Tropical Agriculture**, v.59, n.3, p.227-30, 1982.

JANNUZZI, H. **Caracterização de Dezesseis Acessos de *Lippia Alba* (Mill) N. E. Brown, no Distrito Federal**. Dissertação (de Mestrado)- Faculdade de Agronomia/Universidade de Brasília, Brasília. 2006.

JACQUES, R. A.; FREITAS, L. S.; PÉREZ, V. F.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, A.P.; OLIVEIRA, J. V. e CARAMÃO, E. B. The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: a comparison with maceration. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, p. 6-12, 2007.

JANUZZI, H. et al. Avaliação agronômica e identificação de quimiotipos de erva cidreira do distrito federal. **Horticultura Brasileira**, v.28, n4, p. 412-417, 2010.

JANNUZZI, H. et al. Avaliação agronômica e química de dezesseis acessos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown] - quimiotipo citral, cultivados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 3, p. 258-264, 2011.

JULIÃO, L. S.; TAVARES, E. S.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. (2003). Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br (erva-cidreira). **Rev. Bras. Farmacognosia** In: Simpósio Brasileiro de Farmacognosia. Resumos. p 165. Curitiba, 2000.

KATIYAR, C. K. (2008), Aqueous alcoholic extraction of medicinal. In: HANDA, S. S.; KHANUJA, S. P. S.; LONGO G.; RAKESH, D. D. (eds) **Extraction technologies for medicinal and aromatic plants**. ICS UNIDO, Trieste, p. 111-117.

LANG, Q.; WAI, C. M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies- a practical review. **Talanta**, v. 53, p. 771-782, 2001.

LIST, P. H. e SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical technology**. Londres, 1989.

LOEW, D.; KASZKIN, M. Approaching the problem of bioequivalence of herbal medicinal products. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 8, p. 705-711, 2002.

LONGHINI, R.; RAKSA, S. M.; OLIVEIRA, A. C. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; FRANCO, S. L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica, **Rev. bras. farmacogn**, v. 17, p. 399-395, 2007.

LORENZO, D. P. D.; DAVIES, P.; VILLAR, R.; CANIGUERAL, S.; DELACASSA, E. Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) N. E: Brown from Uruguay. **Flav. Frag. Journal**. v. 16, p. 356- 359, 2001.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. (2001). **Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais**. Museu Paraense Emilio Goeldi.

MACHADO, L. M. M.; NASCIMENTO, R. S.; ROSA, G. S.; "Estudo da Extração de Óleo Essencial e de Compostos Bioativos das Folhas de Eucalipto (*Eucalyptus citriodora*)", p. 5609-5616 . In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014 [= Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, São Paulo: Blucher, 2015.**

MAJORS, R. E.; LC-GC Special Issue on Current Issues in HPLC Technology, May 1997, S8.

MANETTI, L.M.; TURRA, A.F.; TAKEMURA, O.S.; SVIDZINSKI, T.I.E.; LAVERDE JUNIOR, A. Avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica, moluscicida e antioxidante de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, p. 406-413, 2010.

MARTINS, N. M. **Efeitos da *Lippia alba* sobre o comportamento de animais submetidos ao modelo do Labirinto em T Elevado**, Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia, Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia, Brasília, 2014.

MATOS, F. J. A. & OLIVEIRA, F. (1998). *Lippia sidoides* Cham. – Farmacognosia, química e farmacologia. **Rev. Bras. Farm.** 79: 84-87.

MATTOS, S.H.; INNECCO, R.; MARCO, C.A.; ARAÚJO, A.V. **Plantas medicinais e aromáticas cultivadas no Ceará: tecnologia de produção e óleos essenciais**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2007. p. 61-63. (série BNB - ciência e tecnologia 2)

MELO, R.R. et al. Características farmacobotânicas, químicas e biológicas de *Syzygium malaccense* (L.) Merr.& I. M. Perry. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.90, n.4, p.298-302, 2009.

METLEN, K. L.; ASCHEHEHOUG, E. T.; CALLAWAY, R. M. Plant behavioural ecology: dynamic plasticity in secondary metabolites. **Plant, Cell and Environment**: v.32, p. 641-653, 2009.

MING, L.C. **Influência de diferentes níveis de adubação orgânica na produção de biomassa e teor de óleos essenciais de *Lippia Alba* (Mill.) N.E.Br.- Verbenaceae**. 1992. 206 p. Tese. (Mestrado)- Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1992.

MIRANDA, M.; CUELLAR, A. **Farmacognosia y Productos Naturales**. Primeira Edición. La Habana – Cuba. Editorial Félix Varela, 2001,60p.

MORETTO, L. D.; MASTELARO, R. Manual das Denominações Comuns Brasileiras (MDCB). ANVISA/SINDUSFARMA, v. 16, 2013, 706 p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/2013/Manual%20D>

CB%20 2013%20Vers%C3%A3o%20final.pdf Acesso em 06 de Junho, de 2015.

MOURA, P. M et al. Supercritical fluid extraction from guava (*Psidium guajava*) leaves: Global yield, composition and kinetic data. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 62, n. 2, p. 116-122, 2012.

NIEMETZ, R. e GROSS, G. G. (2005), **Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis**. *Phytochemistry*, 66, 2001-2011.

OLIVEIRA A. K. M.; OLIVEIRA N. A.; RESENDE U. M.; MARTINS P. F. R. B. Ethnobotany and traditional medicine of the inhabitants of the Patanal Negro sub-region and the raizeiros of Miranda and Aquidauna, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Braz J Biol**, v. 71, p. 283-9, 2011.

OLIVEIRA, B. Biotransformação da R-(+) e S-(-) carvona por fungos filamentosos, dissertação de Mestrado em Ciências Moleculares, **Universidade Estadual de Goiás**, Anápolis, Brasil, 2009.

OLIVEIRA, G. L.; OLIVEIRA, A. F. M.; ANDRADE, L. H. C. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, Nordeste do Brasil. **Acta Bot Bras.**, v. 24, n. 2, p. 571-7, 2010.

PADUCH, R.; SZERSZEŃ, M. K.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, n. 5, Oct. 2007.

PALÁCIO-LOPÉZ, K.; RODRÍGUEZ-LOPÉZ, N. Plasticidad fenotípica em *Lippia Alba* (Verbenaceae) em respuesta a la disponibilidad hídrica em dos ambientes lumínicos. **Acta Biológica Colombiana**, v.12, n.5, p. 187-198, 2007.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA, D.S.; VILLAR, A. Lippia: Pereira, R.S.; Sumita, T.C.; Furlan, M.R.; Jorge, A.O.C. & Ueno, M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista de Saúde Pública**, v. 2, p. 326-328, 2004.

PATWARDHAN, B.; KHAMBHOLIJA, K.. **Drug Discovery and Ayurveda: Win-Win Relationship Between Contemporary and Ancient Sciences**. Symbiosis International University, v 01, n.01, p.10-15, 2011.

PORTO, C.; STUKER, C. Z.; MALLMANN, A.S.; SIMIONATTO, E.; FLACH, A., CANTO-DOROW, T.; SILVA, U. F.; DALCOL, I. I.; MOREAL, A. F. (R)-(-)-carvone and (1R, 4R)-*trans*-(+)-dihydrocarvone from *Poiretia latifolia* Vogel. **Journal of the Brazilian Chemical Society** v. 21, n. 5, p. 782-786, 2010.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R. DE A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios E Perspectivas. **Química Nova**, v,25, n.1, p.45-61, 2002.

PINO, O.; SANCHEZ, Y.; ROJAS, M. M. Metabolitos secundarios de origen botánico como una alternativa en el manejo de plagas. I: Antecedentes, enfoques

de investigación y tendencias, **Rev. Protección Veg**, v. 28, p. 81-94, 2013.

PIRIZ, M. A.; LIMA, C. A. B.; JARDIM, V. M. R.; MESQUITA, M. K.; SOUZA, A. D. Z.; HECK, R. M. Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: uma revisão de literatura, **Rev. bras. plantas med.**, v. 16, p. 628-636, 2014.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C. e MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**, 4 ed, v.2, 1995.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. F. e MELO, L. F. C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RICCIARDI, G.; VEGLIA, J.; RICCIARDI, A.; BANDONI, A. **Examen de los aceites esenciales de especies de Aloysia (Verbenaceae) del Nordeste. Corrientes**, v.8, p. 100-102, 1999.

RINGER, K. L.; DAVIS, E. M. & Croteau, R. Monoterpene Metabolism . Cloning , Expression , and Dehydrogenase of Peppermint and Spearmint , **Plant Physiology**, v. 137, p. 863–872, 2005.

ROCHA, B. C.; **Extração e caracterização do óleo essencial de tomilho (Thymus vulgaris)**. 2013. 109f.Tese(Mestrado em Ciência de Engenharia Química)- Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

ROSSATO, M.; SANTOS, A.C. A.; SERAFINI, L.A; AGOSTINI, F.; PANSERA, M.R; WASUM, R.; BARBIERI, R.L. Avaliação do óleo essencial de *aloyisia sellowii* (Briquet) *moldenke* (Verbenaceae) Sul do Brasil. **Química Nova**, v.29 n.02, 2006.

RUEDA, S.; CARDENAS, C.; MARTÍNEZ, J.; STASHENKO, E. Estudio de La variación circadiana de los metabolitos secundários volátiles obtenidos por destilación-solvente simultânea, e hojas de *Lippia Alba*(Farm: Verbenaceae). **Scientia et Technica**, v.13, p.83-85, 2007.

SANTOS, L. S.; SILVA, L. S.; FILHO, A. C.; GRIEBELER, G. Quantidade de fósforo extraído pelas soluções de mehlich-1 e mehlich-3 em razão de diferentes velocidades de agitação, tempos de contato e temperatura, **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, v. 39, p. 109-119, 2015.

SILVA, C. P. **Poiretia latifolia e Poiretia teraphilla: Estudos dos Óleos Voláteis e Atividades Biológicas Preliminares**, Dissertação de Mestrado em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, Brasil, 2005.

SILVA F.; SANTOS R. H. S.; ANDRADE N. J.; BARBOSA L. C. A.; CASALI V. W. D.; LIMA R. R.; PASSARINHO R. V. M. Basil conservation affected by cropping season, harvest time and storage period. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**,v.40, p. 323-328.2005.

SILVA G., **Isolamento, caracterização, quantificação e avaliação da pureza enantiomérica de linalol, carvona e limoneno em óleos essenciais de espécies aromáticas**, Dissertação de Mestrado em Química, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Brasil, 2011.

SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN G.; MELLO J. C. P.; MENTZ L. A.; PETROVICK P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFSC; 2003

SEELING, A. P.; GRAZZIOTIN, N. A. Avaliação da Atividade Antivacteriana de Extratos Aquosos de Inflorescências de *Achyrocline satureioides* de Três Marcas Comerciais, **Perspectiva**, v. 38, p. 89-98, 2014.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R., **Farmacognosia: da planta ao medicamento**.

SIMÕES, C.M. O.; SCHEKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C. P.; MENTZ, L. A. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**

SIMÕES, C.M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**.

SENATORE, F. & RIGANO, D. Essential oil of two *Lippia* spp (Verbenaceae) growing wild in Guatemala. **J. Flavour Fragr.** v. 16, p. 169-171, 2007.

SOARES, L. A. L.; GONÇALVES, A. C. A.; BASSANI, V. L.; PETROVICK, P. R. Desenvolvimento tecnológico de solução extrativa aquosa de *Phyllanthus niruri* L. (quebrapedra) empregando planejamento fatorial. **Cad Farm**, v. 14, p. 21-26, 1998.

SOUZA, A. E. F.; RIBEIRO, V. V. Perfil dos raizeiros e estudos de suas indicações acerca das Plantas medicinais utilizadas no tratamento das doenças do trato respiratório. **Revista de Biologia e Farmácia**, v.3, n.1., p. 85-95, 2008.

SOUZA, F. A.; SENA, J.; LEILA, T. M.; OLIVEIRA, C. M. R. e GUIMARÃES, A. T. B. Caracterização fitoquímica preliminar de infusões populares obtidas das partes aéreas das espécies *Apium leptophyllum* (Pers.) F. Muell. ex Benth. (Apiaceae), *Elvira biflora* L. (DC.) e *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae). **Rev. Bras. Farm.**, v.1 ,n.1. p. 24-27, 2008.

SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **Farmacognosia: Coletânea Científica**. Ouro Preto: Editora UFOP, 2012. 372 p.

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

STEFFEN, R. **Oxidação Baeyer-Villiger de Ciclohexanona com Peróxido de Hidrogênio Catalisada por Alumina**, Dissertação de Mestrado em Química Orgânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**, Sinauer Associates Inc. Publisher, 3rd ed, 2002, Sunderland, Massachusetts, USA.

TAVARES, E.S. et al. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1-5, 2005.

TAVARES, I. B.; MOMENTÉ, V. G.; NASCIMENTO, I. R. *Lippia alba*: estudos químicos, etnofarmacológicos e agrônômicos. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 4, n. 1, p. 204–220, 2011.

TONHI E.; COLLINS K.; JARDIM I. C. S. F.; COLLINS C. H. Fases Estacionárias Para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE–FR) Baseadas em superfícies de Óxidos Inorgânicos Funcionalizados. **Quim. Nova**, v.25, p.616-623, 2002.

VALE, M. G. R. **Extração de Hidrocarbonetos em Carvão Mineral Usando SFE, US e Soxhlet**. 1997. 152 p Tese de Doutorado – PPGEMM-UFRGS.

VALE, G. T.; FURTADO, E. C.; SANTOS, G. J.; VIANA, G. S. B. (2002). Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown. **Phytomedicine**. 9: 709-714.

VILEGAS, J. H. Y.; MARCHI, E.; LANÇAS F. M. Determination of coumarin and kaurenoic acid in *Mikania glomerata* (“guaco”) leaves by capillary gas chromatography. **Phytochem Analysis**, v.8, p 74-77, 1997.

WAGNER, K.H. Biological relevance of terpenoids overview focusing on mono, di and tetraterpenes. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v. 47, p. 95-106, 2003.

WITKOWSKA-BANASZCZAKA, E.; BYLKAA, W.; MATYAWSKAA, I.; GOSLINSKAB, O.; MUSZYNSKIB, Z. Antimicrobial activity of *Viola tricolor* herb. **Fitoterapia**, v. 76, p 458-461, 2005.

YAMAMOTO, P.Y. **Interação Genótipo X Ambiente na Produção e Composição de Óleos Essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E.Br.** Dissertação (de Mestrado)- Instituto Agrônômico (IAC), curso de Pós-graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, Campinas, São Paulo. 2006.

ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SANTOS, A. S.; SILVA, M. H. L.; MAIA, J. G. S. (1998). Essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. Grown wild in Brazilian Amazon. **J. Flavour. Fragr.** 13: 47-48.
