



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

REBECA SALES CARDOSO

**DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS FARMACÊUTICAS PARA OBTENÇÃO
DA DROGA VEGETAL A PARTIR DAS FOLHAS DE ERVA-CIDREIRA (*Lippia
alba* (Mill.) N.E. Brown) QUIMIOTIPO II.**

FORTALEZA

2016

REBECA SALES CARDOSO

**DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS FARMACÊUTICAS PARA OBTENÇÃO
DA DROGA VEGETAL A PARTIR DAS FOLHAS DE ERVA-CIDREIRA (*Lippia
alba* (Mill.) N.E. Brown) QUIMIOTIPO II.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para a Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Mary Anne Medeiros Bandeira.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C266d Cardoso, Rebeca Sales.
Desenvolvimento de técnicas farmacêuticas para obtenção da droga vegetal a partir das folhas de erva-cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown) quimiotipo II. / Rebeca Sales Cardoso. – 2016.
62 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2016.

Orientação: Profa. Dra. Mary Anne Medeiros Bandeira.

1. *Lippia alba*. 2. Citral. 3. Marcador químico. I. Título.

CDD 615

REBECA SALES CARDOSO

**DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS FARMACÊUTICAS PARA OBTENÇÃO
DA DROGA VEGETAL A PARTIR DAS FOLHAS DE ERVA-CIDREIRA (*Lippia
alba* (Mill.) N.E. Brown) QUIMIOTIPO II.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para a Saúde.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mary Anne Medeiros Bandeira (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Fabiana Pereira Soares
Universidade de Fortaleza (Unifor)

Profa. Dra. Nirla Rodrigues Romero
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A Deus, único autor da vida e criador dos céus e da terra, toda a honra e glória para sempre.

Aos meu pais, Risoleida e Silas, minhas fontes de inspiração e pilares de sustentação nesta terra, todo amor e gratidão imensuráveis. Sempre serão referências durante a minha existência; e ao meu irmão Saulo, pela parceria e amor compartilhados.

Ao meu esposo Jeferson Colares pela compreensão, ajuda e apoio nesta jornada. Posso contar com seu amor em todos os momentos.

À profa. Mary Anne pela confiança e dedicação. Uma mãe, amiga, conselheira que Deus colocou na minha vida. Uma pesquisadora que se destaca na sua humildade em repassar seus conhecimentos científicos com tanta ternura e inteligência juntas. Seus ensinamentos transcendem seu amor pelas plantas medicinais, criadas por Deus para curar diversos males.

Às alunas e amigas do Laboratório de Plantas Medicinais (LPN) Talita Rocha, Ana Georgina, Karine Lima e Érika Bezerra pelos diversos momentos juntos, divididos alegrias, medos e vitórias conquistadas.

À nossa querida Tia Lourdes pelo seu auxílio e dedicação a todos que se chegam ao LPN e ao Laboratório de Farmacognosia. Bem como ao Dino, sempre de prontidão a ajudar. E a todos do LPN.

Às farmacêuticas e química do LPN e do Núcleo de Fitoterápicos, Amélia, Kellen, Aleksandra e Karla Magalhães.

À mestranda do laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia, Lauana Oliveira, por seu imprescindível auxílio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão do auxílio financeiro.

RESUMO

L. alba, pertencente à família Verbenaceae, é encontrada em praticamente todas as regiões do Brasil. Seus nomes populares são erva-cidreira, falsa-melissa, com ação calmante e ansiolítica. Existem no Nordeste três quimiotipos. Quimiotipo I, rico nos monoterpenos mircenol e citral (neral e geranial); quimiotipo II (limoneno e citral) e o quimiotipo III (limoneno e carvona). *L. alba*, quimiotipo II, foi selecionada pelo Comitê Estadual de Fitoterapia para uso nas Farmácias Vivas do Estado do Ceará, fazendo parte da REPLAME. Apresenta o mesmo marcador químico ativo (citral) que o quimiotipo I e as espécies *Melissa officinalis* e *Cymbopogon citratus*, havendo a necessidade de determinar um marcador químico analítico para diferenciar essas espécies, com fins de controle de qualidade, conforme RDC nº 26/2014. O presente trabalho tem como objetivo realizar o estudo farmacêutico das folhas de *L. alba*, quimiotipo II, com viabilização de técnicas para preparação da droga vegetal com monitoramento do marcador ativo (citral) e a identificação do marcador analítico. Para isso, foi realizada, previamente uma abordagem fitoquímica, evidenciando a presença de esteróides, fenóis livres, flavonóides, triterpenóides, saponinas e taninos condensados, seguida da caracterização morfoanatômica das folhas, apresentando epidermes unicelulares, parênquima paliçádico e lacunoso e tricomas glandulares secretores de óleo essencial, com textura macia e aroma cítrico. Posteriormente, precedeu-se aos ensaios preliminares, onde foram obtidas as especificações de qualidade, como a determinação da perda por dessecação e do teor de cinzas. A composição química do óleo essencial foi avaliada por CG/EM durante o período de maio/1988 a março/2016 em que foi observado um aumento no teor do óleo, influenciado, provavelmente, pelo número de cortes sofridos, destacando como componentes majoritários neral, geranial e limoneno. Em seguida, o óleo essencial das folhas frescas e dessecadas, à sombra em temperatura ambiente, e em estufa a 40°C, extraído por coação e arraste à vapor d'água foi analisado por CG/EM. O extrato etanólico 20% e o óleo essencial foram comparados por CCD, evidenciando manchas com R_fs e comportamentos semelhantes. O extrato etanólico 20% foi separado por CCA, isolada uma substância por CEM e analisada por RMN ¹H, sendo denominada ECII de marcador químico analítico da espécie *L. alba*. A técnica de arraste à vapor d'água e a dessecação de folhas em temperatura ambiente por 5 dias, demonstrou ser o método de obtenção do óleo essencial com maior rendimento, mais viável e de menor custo. **Palavras-chave:** *Lippia alba*. citral. Marcador químico.

ABSTRACT

Lippia alba, belongs to Verbenaceae family, is found in almost all regions of Brazil. Its popular names are lemongrass, false-melissa, with calming and anxiolytic action. There are three chemotypes in the Northeast. Chemotype I, rich in myrcene and citral (neral and geranial) monoterpenes; chemotype II (limonene and citral), and chemotype III (limonene and carvone). *L. alba*, chemotype II, was selected by Phytotherapy State Committee for use in the “Farmácias Vivas” in Ceará State, as part of REPLAME. It features the same active chemical marker (citral) that chemotype I and the species *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*, with the need to determine a analytical chemical marker to distinguish these species, quality control purposes, according to RDC N° 26/2014. This study aims to conduct the pharmaceutical study of the leaves of *L. alba*, chemotype II, enabling techniques for preparation of plant drug monitoring with active marker (citral) and the identification of analytical marker. For this, it was made previously one phytochemical approach, showing the presence of steroids, free phenols, flavonoids, triterpenoids, saponins and tannins, followed by morphoanatomical leaves, with unicellular epidermis, palisade and spongy parenchyma, glandular trichomes secreting oil essential, with soft texture and citrus scent. Later, it preceded the preliminary tests where the quality specifications were obtained, such as determining the loss on drying and the ash content. The essential oil chemical composition was evaluated by GC / MS during the period from May /1988 to March / 2016 in which it was seen an increase in oil content, influenced probably by the number of suffered cuts, highlighting how neral, geranial and limonene major components. Then, essential oil of fresh and dried leaves in the shade at room temperature and in an oven at 40 °C extracted cohobation and drag to water vapor was analyzed by GC /MS. The alcoholic extract 20% and the essential oil were compared by TLC, showing spots with Rf s and similar behaviors. The 20% alcoholic extract was separated by CCS and isolated a substance by CME and identified by NMR, being called analytical chemical marker of the species *L. alba*. The technique drag to water vapor and drying the leaves at room temperature for 5 days, proved to be the method of obtaining the essential oil with increased yield, more viable and less expensive. **Keywords:** *Lippia alba*. citral. chemical marker.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown	19
Figura 2 - Estruturas químicas dos terpenos do óleo essencial de <i>L. alba</i> quimiotipo II	23
Figura 3 - Estruturas químicas da constituição não-volátil de <i>L. alba</i> quimiotipo II	24
Figura 4 – Estrutura química do verbascosídeo	25
Figura 5 - Coluna cromatográfica de amido	33
Figura 6 - Morfologia da folha fresca e da droga vegetal de <i>L. alba</i> quimiotipo II	37
Figura 7 - Fotomicrografia de corte transversal da anatomia das folhas de <i>L. alba</i> quimiotipo II	38
Figura 8 - Fotomicrografias de corte transversal das folhas de <i>L. alba</i> , quimiotipo II, tratado com SUDAN III	39
Figura 9 - Fotomicrografia da droga vegetal pulverizada de <i>L. alba</i> , quimiotipo II, corado com SUDAN III	39
Figura 10 – Espectro de massa de neral no óleo essencial coletado em março/2016, às 9 h	41
Figura 11 - Espectro de massa de geranial no óleo essencial coletado em março/2016, às 9 h	41
Figura 12 - Espectro de massa de limoneno no óleo essencial coletado em março/2016, às 9 h	41
Figura 13 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>L. alba</i> analisado em março/2016... ..	42
Figura 14 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>L. alba</i> analisado em novembro/ 2015	42
Figura 15 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>L. alba</i> analisado em março/2002	43
Figura 16 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>L. alba</i> analisado em janeiro/1996	43
Figura 17 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>L. alba</i> analisado em setembro/1995	44
Figura 18 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>L. alba</i> analisado em	

maio/1988	44
Figura 19 – Perfil cromatográfico dos óleos essenciais obtidos por arraste a vapor, coobação e do extrato etanólico 20%	46
Figura 20 – Placas cromatográficas de sílica das frações isoladas em coluna de sephadex. Revelação em câmara de luz ultravioleta (A) e revelação em solvente revelador universal (B)	46
Figura 21 – Estrutura química do iridóide mussaenosídeo	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Prospecção dos constituintes químicos presentes nas folhas de <i>Lippia alba</i> quimiotipo II	35
Tabela 2 - Resultados para a determinação de perda por dessecação	36
Tabela 3 – Composição química do óleo essencial de folhas de <i>L. alba</i> , quimiotipo II, coletadas em março/2016, às 9 h	40
Tabela 4 - Teores de neral, geranial e limoneno nos óleos essenciais extraídos por arraste à vapor nos períodos de março/2016, novembro/2015, março/2002, janeiro/1996, setembro/1995 e maio/1988, obtidos a partir das folhas coletadas no horto FJAM	45
Tabela 5 – Rendimento de óleo essencial e teor dos constituintes químicos majoritários do óleo essencial de <i>L. alba</i> , quimiotipo II, extraído por coobação, comparando com folhas frescas, dessecadas à sombra e em estufa	46
Tabela 6 – Rendimento de óleo essencial e teor dos constituintes químicos majoritários do óleo essencial de <i>L. alba</i> , quimiotipo II, extraído por arraste à vapor, comparando com folhas frescas, dessecadas à sombra e em estufa	47

LISTA DE TABELAS

ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
BZD	Benzodiazepínicos
CAPS	Centro de Apoio Psicossocial
CCA	Cromatografia em Coluna de Amido
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CEM	Cromatografia de Exclusão Molecular
FAA	Formaldeído Ácido Acético
FJAM	Francisco José de Abreu Matos
NUFITO	Núcleo de Fitoterápicos
OMS	Organização Mundial da Saúde
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
REPLAME	Relação Estadual de Plantas Mediciniais
Rf	Fator de Retenção
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
Tr	Tempo de Retenção
min	minutos
UFC	Universidade Federal do Ceará
UV	Ultravioleta
OEA_r	Óleo Essencial extraído por arraste a vapor
OEC_o	Óleo Essencial extraído por coação
EA	Extrato Etanólico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 JUSTIFICATIVA	17
3 OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo geral	18
3.2 Objetivos específicos	18
4 REFERENCIAL TEÓRICO	19
4.1 <i>Lippia alba</i> (Cidreira)	19
4.1.1 Óleo essencial e caracterização de germoplasma de <i>Lippia alba</i>	21
4.1.2 Estudos de atividade farmacológica de <i>L. alba</i>	24
4.2 <i>Melissa officinalis</i> L.	26
4.3 <i>Cymbopogon citratus</i>.	27
4.4 Benzodiazepínicos (BZDs)	28
4.4.1 Efeitos colaterais e uso abusivo dos BZDs	29
5 MATERIAIS E MÉTODOS	29
5.1 Material	29
5.1.1 Colheita do material botânico	29
5.1.2 Equipamentos	30
5.1.3 Solventes e reagentes	30
5.2 Métodos	30
5.2.1 Abordagem fitoquímica	30
5.2.2 Determinação da perda por dessecação da droga	31
5.2.3 Determinação do teor de cinzas	31
5.2.4 Análise morfológica	31
5.2.5 Análise anatômica	31
5.2.6 Análise anatômica da droga pulverizada	32
5.2.7 Avaliação do banco de germoplasma	32
5.2.8 Desenvolvimento de técnicas de dessecação das folhas de <i>Lippia alba</i> com determinação dos teores de umidade e de óleo essencial	32
5.2.9 Seleção do método de extração do óleo essencial	33
5.2.9.1 Coação	33

5.2.9.2 Arraste a vapor d'água.....	33
5.2.10 Determinação do perfil cromatográfico por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) do óleo essencial	33
5.2.11 Análise do óleo essencial por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)	33
5.2.12 Purificação e isolamento dos constituintes químicos do extrato etanólico	34
5.2.12.1 Cromatografia em coluna de amido	34
5.2.12.2 Isolamento por Cromatografia de exclusão molecular (CEM)	34
5.2.12.3 Identificação do marcador químico analítico	35
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
6.1 Abordagem fitoquímica	35
6.2. Determinação da perda por dessecação das folhas	35
6.3 Determinação do teor de cinzas	36
6.4 Caracterização morfoanatômica	36
6.5 Avaliação do banco de germoplasma	39
6.6 Determinação do perfil cromatográfico dos óleos essenciais e do extrato etanólico 20% por CCD	45
6.7 Análise dos óleos essenciais por CG/EM: dessecação x extração.....	46
6.8 Purificação e isolamento dos constituintes químicos do extrato etanólico....	48
7 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da fitoterapia para sua atenção primária, tendo em vista que 80% desta população recorrem às práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas medicinais (WHO, 2011). Entretanto, o aumento destas práticas não é proporcional à qualidade dos fitoterápicos, no que se refere aos critérios recomendados de eficácia, de segurança e de qualidade, estabelecidos pela Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 26/2014 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2014) que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.

O reconhecimento da importância das plantas para o desenvolvimento de fármacos modernos e eficazes foi oficializado pelo lançamento da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada pelo Decreto nº 5.813 em 22 de junho de 2006. Essa Política estabelece diretrizes voltadas à garantia do acesso seguro, ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, ao fortalecimento dos arranjos produtivos e ao uso sustentável da biodiversidade brasileira (BRASIL, 2006).

A OMS considera as plantas medicinais como importante instrumento da assistência farmacêutica. Assim, por meio de resoluções, expressa sua posição a respeito da necessidade de valorizar a sua utilização no âmbito sanitário, e observa que 70% a 90% da população nos países em vias de desenvolvimento depende delas no que se refere à Atenção Primária à Saúde (WHO, 2011).

De forma semelhante no Brasil, cerca de 82% da população brasileira utiliza produtos à base de plantas medicinais nos seus cuidados com a saúde, seja pelo conhecimento tradicional ou pelos sistemas oficiais de saúde, como prática de cunho científico, orientada pelos princípios e diretrizes do Sistema Único de Saúde (SUS) (RODRIGUES; DE SIMONI, 2010). A utilização da fitoterapia nos programas de atenção primária de saúde pode constituir alternativa terapêutica, por sua eficácia, seu baixo custo operacional e a compatibilidade cultural com as práticas de saúde da população atendida (MATOS, 2002).

Para tentar minimizar o problema, foi criado o Projeto Farmácias Vivas que é um programa de assistência social farmacêutica baseado no emprego científico de plantas medicinais e fitoterápicos, idealizado pelo Professor Francisco José de Abreu Matos e organizado sob a influência da OMS. As plantas medicinais incluídas nas Farmácias Vivas possuem eficácia e segurança terapêuticas comprovadas e certificação botânica expedida pelo Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Através desse projeto, foi proposto o uso de uma metodologia que levasse às comunidades dois níveis de atendimento na área de fitoterapia: preparação, prescrição e dispensação de fitoterápicos na rede pública de saúde, SUS, e orientação sobre o uso correto de plantas medicinais e preparações caseiras.

Com o apoio técnico-científico do Projeto Farmácias Vivas, a fitoterapia em Saúde Pública no Estado do Ceará foi institucionalizada em 1997, com a criação do Centro Estadual de Fitoterapia, para o desenvolvimento do Programa Estadual de Fitoterapia. No ano de 2007, esse Centro foi instituído como Núcleo de Fitoterápicos da Coordenadoria de Assistência Farmacêutica da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (NUFITO), que integrado ao Projeto Farmácias Vivas/Horto de Plantas Medicinais Francisco José de Abreu Matos da UFC, tem como objetivo instalar unidades Farmácias Vivas em Organizações Governamentais e não-Governamentais, com acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos.

Por meio da portaria do Secretário de Saúde do Estado do Ceará (Portaria nº 275/2012), em 30 de Dezembro de 2009, através do Decreto nº 30016, foi designada a Relação Estadual de Plantas Medicinais (REPLAME-CE). Foram listadas 30 plantas medicinais regionais selecionadas de modo a garantir a permanente disponibilidade para a população dando suporte a prevenção, diagnóstico e tratamento das doenças prevalentes no Ceará (BANDEIRA et al., 2015).

Dentre as plantas da REPLAME-CE, consta a espécie vegetal *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, quimiotipo II. Matos (2007) realizou a identificação de pelo menos três quimiotipos ou raças químicas nessa espécie, com base na composição dos óleos essenciais, encontrada no Nordeste brasileiro.

A *L. alba* é conhecida como erva cidreira. É comum o seu uso na preparação caseira de chás por infusão com propriedades calmantes, sendo frequentemente utilizada como sucedânea da cidreira verdadeira (*Mellissa officinalis* L.) e do capim-santo (*Cymbopogon citratus*) que também apresentam óleo essencial rico em citral, que é a mistura dos isômeros neral e geranial (ROCHA, 2011; ACEVEDO; NAVARRO; MONTEIRO, 2013). Assim sendo, estudos comprovaram que a erva-cidreira possui ação calmante e espasmolítica atribuídas ao citral e uma menor atividade analgésica dada ao componente limoneno, sendo, portanto, o quimiotipo II indicado nos casos de ansiedade e estados de inquietude (MATOS, 2007).

Convém ressaltar que a ansiedade é o sintoma mais comum em psiquiatria e uma das mais frequentes na clínica médica, podendo acometer até 10% da população mundial de forma quase permanente (WHO, 2016). Concomitantemente, os medicamentos benzodiazepínicos (BZD) tem sido um dos grupos farmacológicos mais prescritos nos casos

de ansiedade na maioria dos países desenvolvidos (LAGNAOUI et al., 2004; HOLLINGWORTH; SISKIND, 2010).

O consumo desses BZDs a longo prazo está associado a uma série de riscos para a saúde da população. Embora sejam drogas relativamente seguras, restrições à sua utilização têm sido cada vez maiores, devido à incidência dos efeitos colaterais relacionados à depressão do sistema nervoso central (ANDREATIN; BOERNGEN-LACERDA; ZORZETTO FILHO, 2001). Dentre eles, a diminuição da atividade psicomotora, o prejuízo na memória, a tolerância e dependência (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012). Uma das alternativas para tentar diminuir o elevado percentual de consumo e as conseqüências do tratamento a longo prazo dos BZDs seria a introdução de um medicamento natural com eficácia comprovada e que garantisse o mesmo efeito farmacológico dos medicamentos ansiolíticos.

Visando suprir essa necessidade, foi realizado um acompanhamento de pacientes em uso do elixir de *Lippia alba* 8% em um Centro de Apoio Psicossocial (CAPS), sob prescrição médica. Os resultados demonstraram que o uso deste fitoterápico em pacientes com quadros depressivos e de ansiedade, influenciou de maneira positiva na qualidade de vida destes indivíduos (GOMES, 2014).

Assim, por meio da fitoterapia baseada em evidências, Gomes (2014) realizou um estudo epidemiológico de natureza quase experimental, visando fundamentar uma política de cuidado na prevenção da dependência farmacológica dos BZDs. Os resultados apontaram influência positiva do uso do fitoterápico na qualidade de vida dos usuários, podendo-se afirmar que o elixir de *Lippia alba* 8% mostrou-se capaz de funcionar como tratamento coadjuvante e alternativo em substituição aos ansiolíticos. Através desse estudo foi possível a redução de danos gerados pelo massivo uso dos BZDs e o apoio à saída da dependência destes (GOMES, 2014).

Importante ressaltar que a RDC nº 26 de 13 de maio de 2014, da ANVISA que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos, define droga vegetal como planta medicinal, ou suas partes, que contenham as substâncias responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta/colheita, estabilização, quando aplicável, e secagem, podendo estar na forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada (BRASIL, 2014).

Somado a isso, a RDC 26/2014 exige a determinação de marcadores químicos para as formulações, trazendo o conceito de marcador químico e fazendo distinção entre os dois tipos (ativo e analítico). Um marcador químico ativo é aquele relacionado à atividade

terapêutica, no caso da erva cidreira é o citral, responsável por sua ação calmante. Um marcador químico analítico é aquele que ainda não foi demonstrada a relação do constituinte com a atividade terapêutica do fitocomplexo (BRASIL, 2014).

Através de um diagnóstico situacional da fitoterapia em Saúde Pública do Estado do Ceará, especificamente das Farmácias Vivas, observou-se que uma das necessidades mais apontadas pelos farmacêuticos é a ausência na realização de estudos de viabilização e controle de qualidade na produção dos fitoterápicos (BARBOSA, 2007).

Com base no exposto, este trabalho objetivou o desenvolvimento de técnicas farmacêuticas, visando a obtenção e garantia da qualidade da droga vegetal, sendo estruturado em dois aspectos principais: preparação da droga vegetal com monitoramento do marcador químico ativo (citral) e da umidade, e a identificação do marcador químico analítico da espécie em estudo.

2. JUSTIFICATIVA

Existem no Nordeste três quimiotipos de *Lippia alba* caracterizados cientificamente pela composição química dos seus óleos essenciais. Quimiotipo I, óleo rico nos monoterpenos mirceno e citral (neral e geranial); quimiotipo II rico em limoneno e citral; e o quimiotipo III, cujo óleo apresenta limoneno e carvona como componentes majoritários.

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown, quimiotipo II, é referida popularmente como cidreira carmelitana e foi selecionada pelo Comitê Estadual de Fitoterapia para integrar o elenco de plantas medicinais de uso nas Farmácias Vivas do Estado do Ceará, fazendo parte da REPLAME (Portaria 275/2012) (MATOS, 2002; BANDEIRA et al., 2015).

A espécie *L. alba* quimiotipo II apresenta o mesmo marcador químico ativo (citral) que do quimiotipo I e outras espécies, tais como, a cidreira verdadeira (*Melissa officinalis*) e o capim-santo (*Cymbopogon citratus*). Há, pois, a necessidade de determinar o marcador químico analítico para diferenciar essas espécies, com fins de controle de qualidade, conforme RDC 26/2014.

A composição e o teor do óleo essencial da erva-cidreira apresentam variações qualitativas e quantitativas que dependem de fatores como a variação genética, ou seja, a existência de mais de um quimiotipo e a quantidade de água circulante (CORRÊA, 1992; MATOS, 1998; TAVARES et al., 2005). No caso deste trabalho com a *L. alba* quimiotipo II é importante a avaliação dessas variáveis para a obtenção da droga vegetal, necessitando observar métodos de pós-colheita, como técnicas de preparação da droga, a fim de determinar

meios que proporcionem maior concentração de constituintes químicos de interesse.

O elixir de erva-cidreira é um fitoterápico dispensado com prescrição médica, existindo uma demanda importante para o CAPS por sua indicação nos quadros de ansiedade, conforme estudo local realizado por Gomes (2014).

Por se tratar de uma formulação farmacêutica pioneira no Ceará, em processo de aprimoramento, a obtenção da droga vegetal com qualidade será fundamental para a preparação do extrato fluido, o qual influenciará também na qualidade do elixir de cidreira, contribuindo de forma efetiva para a saúde e bem-estar da comunidade.

Além disso, este estudo gerará dados que irão compor o quadro de informações científicas para as Farmácias Vivas, de acordo com a RDC nº 18/2013 que dispõe sobre as boas práticas de processamento e armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e officinais de plantas medicinais e fitoterápicos em farmácias vivas no âmbito do SUS (BRASIL, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo farmacêutico das folhas de cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown), quimiotipo II, com viabilização de técnicas para preparação da droga vegetal com monitoramento do marcador químico ativo (cital) e a identificação do marcador químico analítico.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a abordagem fitoquímica nas folhas dessecadas de *L. alba*, quimiotipo II;
- Estabelecer características morfoanatômicas da droga vegetal de *L. alba*, quimiotipo II;
- Avaliar a composição química do óleo essencial de *L. alba* quimiotipo II no banco de germoplasma do horto FJAM da UFC.
- Selecionar o método de extração com melhor rendimento de óleo essencial;
- Desenvolver técnicas de preparação da droga vegetal de *L. alba*, quimiotipo II com monitoramento do marcador químico ativo (cital);
- Determinar o marcador químico analítico para o desenvolvimento de técnicas de controle de qualidade químico das folhas de *L. alba*, quimiotipo II.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 *Lippia alba* (Cidreira)

Lippia alba (Mill.) N.E. Brown (Figura 1) pertence à família Verbenaceae que também inclui outras plantas medicinais importante como o cidrão [*Aloysia triphylla* (L'Hérit.) Britt.], gervão (*Verbena officinalis* L.) (HENNEBELLE et al., 2008), e alecrim-pimenta [*Lippia sidoides* Cham.](MATTOS et al., 2007). Esta família compreende mais de 175 gêneros e 2.800 espécies na África, América Latina (ARA et al., 2009) e na Índia (MESA-ARANGO et al., 2009; SHUKLA et al., 2009). A espécie tem ampla distribuição no Centro e Sul das Américas, no sul dos Estados Unidos (Flórida), também presente na Índia e na Austrália (PASCUAL et al., 2001; HENNEBELLE et al., 2008). No Brasil, ela é encontrada em praticamente todas as regiões (JANNUZZI et al., 2011).

Figura 1- *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Seus nomes mais comuns são: erva-cidreira, falsa-melissa, chá-de-tabuleiro, erva cidreira-do-campo, salva-do-Brasil, salva-limão e erva-cidreira-brava (MATOS, 2000), chá-

da-febre, erva-cidreira-brasileira, alecrim do campo (HOLETZ et al., 2002), erva cidreira de arbusto, alecrim, alecrim selvagem, camará, capitão do mato, cidrão, cidró, cidreira, capim cidreira, cidreira falsa, entre outras (SILVA; SALIMENA, 2002). O nome popular "cidreira", usado no Brasil para designar espécies aromáticas de várias famílias botânicas, também é usado para *Lippia alba*. Os aromas estão relacionados com os constituintes químicos (terpenos) que prevalecem no seu óleo essencial (mistura complexa de substâncias voláteis lipofílicas (CASTRO et al., 2004).

L. alba é um arbusto de morfologia variável, alcançando até um metro e meio de altura, raramente dois metros, nativa de quase todo território brasileiro. Seus ramos são finos, esbranquiçados, arqueados, longos e quebradiços. As folhas são inteiras, opostas de bordos serrados e ápice agudo, de 3-6 cm de comprimento. Flores azul-arroxeadas, reunidas em inflorescências axilares capituliformes de eixo curto e tamanho variável. Os frutos são drupas globosas de cor róseo-arroxeadas (LORENZI; MATOS, 2008).

Morfologicamente, a erva-cidreira quimiotipo I (citrinal e mirceno) tem folhas ásperas, grandes e inflorescência com até 8 flores linguladas externas em torno de um amplo conjunto de flores ainda fechadas. Na erva-cidreira quimiotipo II (citrinal e limoneno) e III (carvona e limoneno), as folhas são menores e macias, as inflorescências são menores que o tipo I, com um pequeno disco central de flores ainda não desenvolvidas rodeado por apenas três a cinco flores linguladas (MATOS, 1998). Aparentemente, não há diferenças anatômicas relevantes entre os quimiotipos desta espécie (SANTOS, 2003), inverso às suas características organolépticas e morfológicas, cujas variações são muito evidentes, de acordo com o que foi descrito por Matos (2000).

As folhas das plantas do quimiotipo III caracterizam-se por possuir epiderme simples, revestida por cutícula relativamente espessa e estômatos com ampla câmara subestomática, situados em ambas as faces; mesófilo formado por parênquima paliçádico uni ou biestratificado e três ou quatro camadas de parênquima esponjoso. Nas folhas também estão presentes quatro tipos de tricomas, um tector (com ápice agudo e base elevada por células epidérmicas) e três glandulares. Os tricomas glandulares sésseis estão presentes na face abaxial formado por célula basal, intermediária e porção capitada bicelular. Os dois últimos tipos encontram-se distribuídos em ambas as faces foliares (SANTOS, 2003).

Testes histoquímicos realizados em folhas de *L. alba*, provenientes do Jardim Botânico do Rio de Janeiro indicaram que o óleo essencial está presente nos tricomas glandulares e tectores em todo mesófilo no parênquima da nervura principal e ao redor do

sistema vascular da nervura (VENTRELLA, 2000; SANTOS-MENDES, 2001; AMARAL; SANTOS, 2014).

Os metabólitos secundários descritos para *L. alba* incluem flavonóides, taninos, saponinas, iridóides triterpênicos, resinas, mucilagem e óleo essencial. Terpenóides, especialmente mono e sesquiterpenos, têm diferentes funções, como proteção contra danos oxidativos (BARROS et al., 2009) e atividade antimicrobiana (DONSI et al., 2011).

4.1.1 Óleo essencial e caracterização de germoplasma de *L. alba*

Estudos afirmam que as condições ambientais são capazes de causar variações significativas, dando origem aos quimiotipos ou raças químicas frequentes em plantas ricas em óleos essenciais. Isto implica em variadas composições dos diferentes quimiotipos da espécie *L. alba*, ou seja, não constituem um produto só da influência de fatores ambientais, mas refletem também a variação genotípica destas plantas (TAVARES et al., 2005).

Os óleos essenciais são produzidos nas três vias do metabolismo secundário: chiquimato (compostos aromáticos), mevalonato (derivados dos terpenoides) e malonato (ácidos graxos saturados e insaturados, os polifenóis e os poliacetilenos), principalmente nas duas últimas (CORAZZA, 2002). Estes são constituídos principalmente de terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos) (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993; CASTRO et al., 2004; AMARAL; SANTOS, 2014).

O rendimento do óleo essencial é afetado por vários fatores como clima, solo, regiões geográficas, duração do dia e noite, idade da planta, órgão onde se localiza, condições de estresse, número de cortes por ano, etc (MATTOS et al., 2007; MARTÍNEZ; BERNAL; CÁCERES, 2000). A composição e concentração dos compostos químicos no óleo essencial dependem do controle genético e dos estímulos em resposta aos diferentes fatores, mudando continuamente com o tempo e o espaço (MATTOS, 2000; SANTOS, 2003; EHLERT, 2003), podendo ocorrer uma variabilidade genética na espécie (AMARAL; SANTOS, 2014).

No caso da *L. alba* apresentar grande variabilidade genética pode ser favorável aos programas de melhoramento, por outro lado, a variabilidade de tipos químicos pode ser considerada preocupante do ponto de vista de utilização da planta como fitoterápico, pois o paciente poderá utilizar um produto não adequado para atingir o objetivo terapêutico (JANNUZZI et al., 2010).

Análise por cromatografia gás-líquido acoplada a espectrometria de massa dos óleos essenciais das folhas de *L. alba*, obtidos por coação, em um estudo de sazonalidade, permitiu validar a existência de três quimiotipos: quimiotipo I, óleo rico nos monoterpenos

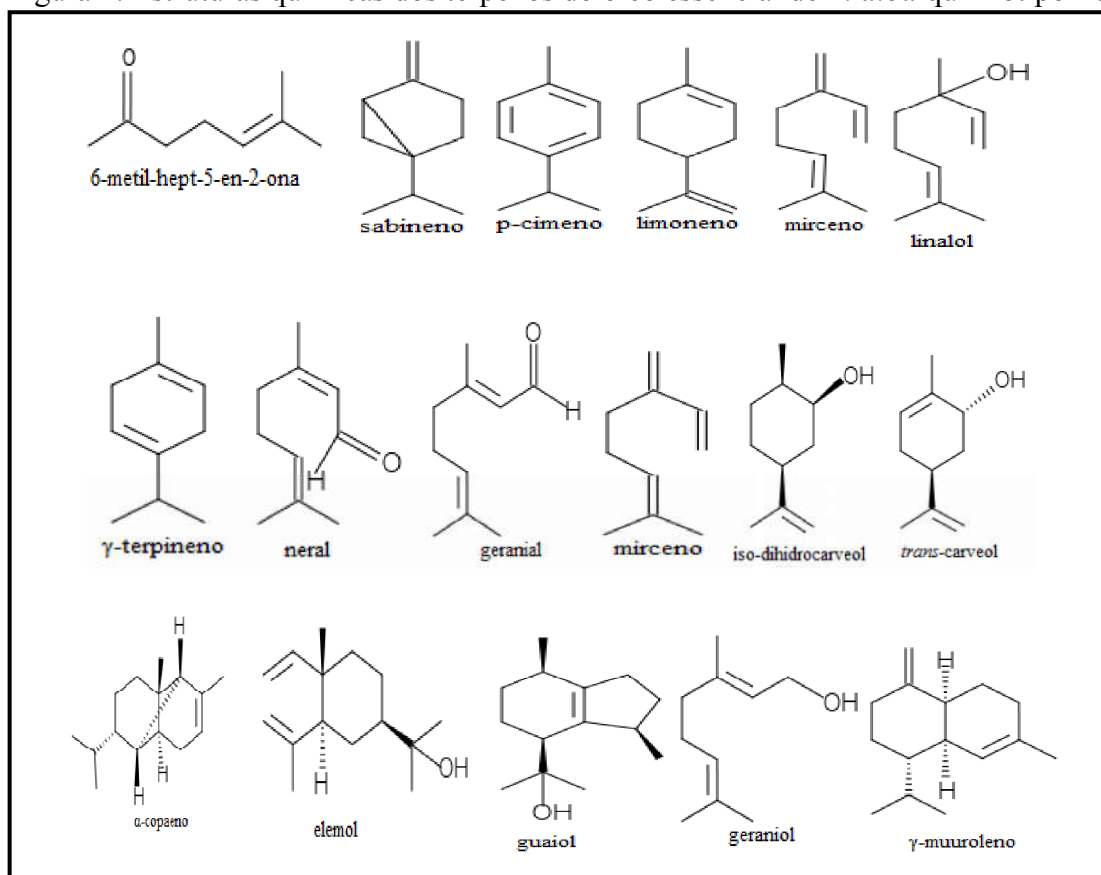
mirceno e citral (mistura dos constituintes neral e geranial); quimiotipo II rico em limoneno e citral (mistura dos constituintes neral e geranial) e o quimiotipo III, cujo óleo apresenta limoneno e carvona como componentes majoritários (BARBOSA, 2003). Tavares et al. (2005), Shukla et al. (2009) e Mesa-Arango et al. (2009) afirmaram que os principais constituintes do óleo essencial de *L. alba*, foram os monoterpenos geranial variando de 22,21% a 33,98%, e neral variando de 14,20% a 25,82%.

Os terpenos são compostos biossinteticamente derivados de isopreno, unidades com a fórmula molecular C_5H_8 . A fórmula básica de todos os terpenos é $(C_5H_8)_n$, onde n é o número de unidades de isopreno ligados (GAO; SINGH, 1998). Unidades de isopreno podem ser ligadas para formar cadeias lineares ou podem ser dispostas de modo a formarem anéis. Os terpenos podem existir como hidrocarbonetos ou ter compostos contendo oxigênio, tais como os grupos hidroxila, carbonila, cetona, aldeído. Depois da modificação química de terpenos, os compostos resultantes são referidos como terpenoides. Os monoterpenos consistem em duas unidades de isopreno (C_{10}) e pode ser linear (mirceno, geraniol) ou pode conter anéis (timol, mentol, α -pineno). Sesquiterpenos consistem em três isopreno unidades (C_{15}) e pode ser acíclica (farnesol) ou conter anéis, bem como muitas outras modificações (δ -cadineno). Diterpenos consistem em quatro unidades de isopreno (C_{20}). Triterpenos consistem em seis unidades de isopreno (C_{30}) (PADUCH et al., 2007).

No Nordeste do Brasil, foi verificada a ocorrência de diferentes tipos químicos (quimiotipos) da espécie, cuja variabilidade foi identificada a partir da análise dos terpenos constituintes do óleo essencial. Estes quimiotipos receberam as designações de acordo com os constituintes majoritários encontrados: citral (55,1%), b-mirceno (10,5%), e limoneno (1,5%) no quimiotipo I; citral (63,0%) e limoneno (23,2%) no quimiotipo II; carvona (54,7%) e limoneno (12,1%) no quimiotipo III (MATOS et al., 1996; MATOS, 2000).

Barbosa (2003) obteve vários constituintes químicos do quimiotipo II, tanto no óleo essencial (Figura 2), quanto metabólitos isolados da constituição química não-volátil de *L. alba* (Figura 3). No óleo essencial foram verificados os monoterpenos: sabineno, mirceno, p-cimeno, limoneno, γ -terpineno, iso-dihidrocarveol, trans-carveol, neral e geranial; e os sesquiterpenos: α -cubebeno, ciclosativeno, β -cubebeno, E-cariofileno, allo-aromadendreno e (Z)- γ -bisaboleno.

Figura 2: Estruturas químicas dos terpenos do óleo essencial de *L. alba* quimiotipo II.

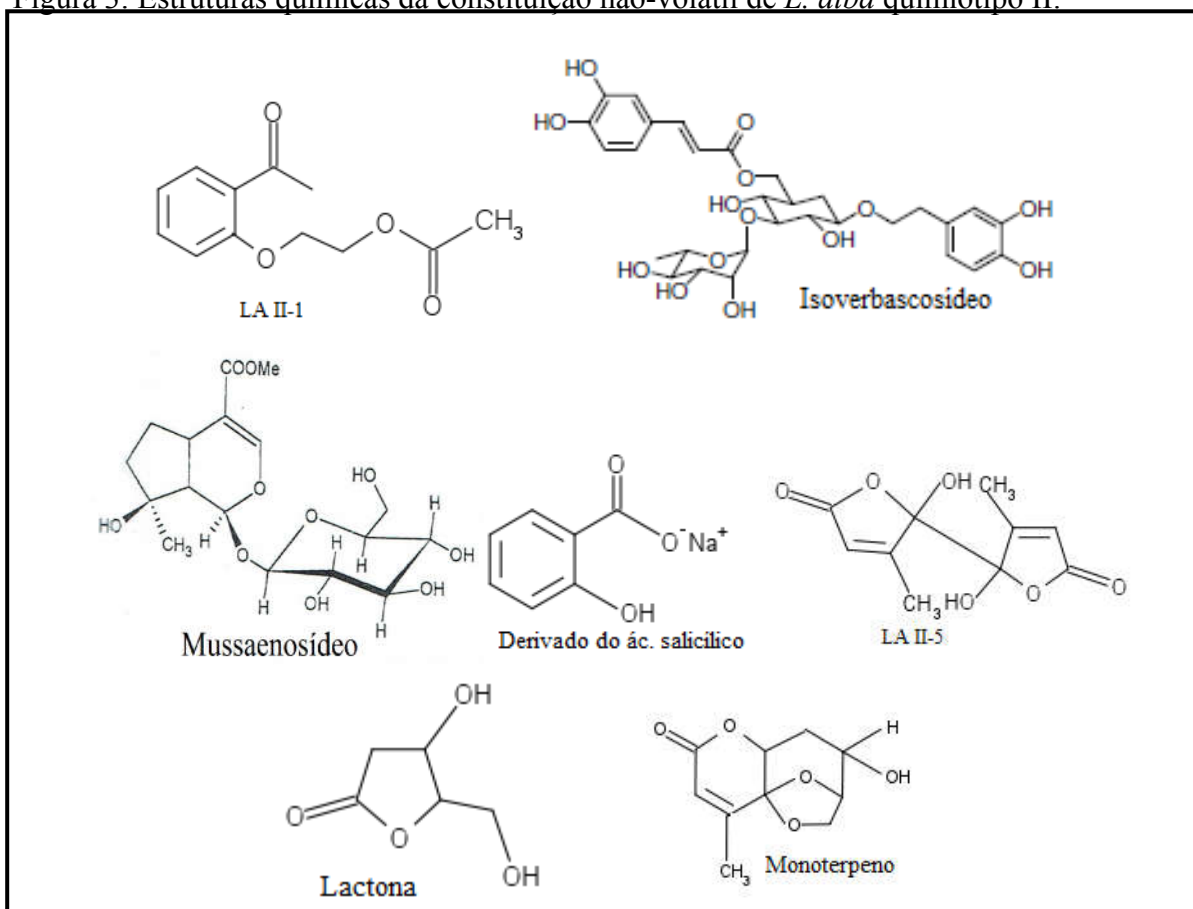


Fonte: Barbosa (2003).

O citral é o constituinte principal encontrado no óleo essencial de *L. alba* no quimiotipo II e é uma mistura de dois isômeros que são estruturalmente diferentes, mas têm a mesma fórmula molecular: trans-geranial e cis-neral (DEVI; SIM; ISMAIL, 2011). Vários estudos têm relatado as ações farmacológicas de citral, os quais incluem antiespasmódica, antiinflamatória (PONCE-MONTER et al., 2010), sedativa (DO VALE et al., 2002), e efeitos antinociceptivos (ORTIZ et al., 2010) com atividade analgésica (CUNHA et al., 2010; SOUSA et al., 2015).

Barbosa (2003) determinou oito estruturas químicas pertencentes à constituição química não-volátil de *L. alba* quimiotipo II sob a justificativa de que a produção de metabólitos voláteis é mais sensível aos fatores extrínsecos e edafoclimáticos do que a produção de metabólitos secundários não-voláteis, evitando falhas na classificação da espécie. As estruturas químicas isoladas (Figura 3) possuem comportamento polar, presentes nas frações polares. São elas: LAII-1, isoverbasosídeo, mussaenosídeo, derivado do ácido salicílico, LAII-5, γ -lactona e monoterpene (PÉRTILE, 2007).

Figura 3: Estruturas químicas da constituição não-volátil de *L. alba* quimiotipo II.



Fonte: Barbosa (2003).

A medicina popular tem relatado o tratamento de diversas doenças com preparados a partir de *L. alba* - folhas ou raízes - entre eles problemas estomacais, cefaleia, gripes e resfriados, calmante, combate a insônia, além de tratar, dores de cabeça e até hipertensão arterial. Ação antiprotozoário, bactericida e antifúngico (TAVARES; MOMENTÉ; NASCIMENTO, 2011). Outras propriedades têm sido atribuídas, quando essa planta é utilizada na forma de chás, macerada, em compressas e dissolvida na água dos banhos, tais como: antipirética, anti-inflamatória, enemagoga, diaforética, analgésica atividade antidepressiva (JULIÃO et al., 2003; HENNEBELLE et al., 2008).

Pascual et al. (2001) identificaram uma poderosa atividade antiulcerogênica na infusão de folhas de erva-cidreira na úlcera gástrica de ratos Wistar induzidos pela indometacina.

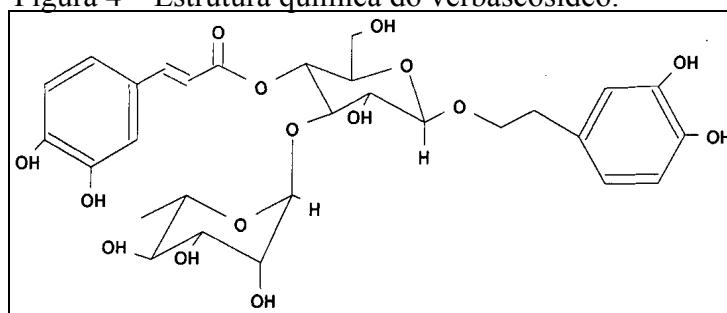
Um protocolo de coorte, longitudinal e prospectivo, com vinte e um pacientes, revelou que o extrato alcoólico (um litro de álcool para 200 g da planta *in natura*) de *L. alba* é

eficaz na redução, intensidade e frequência de episódios de cefaleia em pacientes com enxaqueca. Cerca de 80% dos pacientes experimentaram uma redução de 50% ou mais em intensidade e frequência de episódios de dor após um tempo médio de 54 dias ou 7,7 semanas. O estudo relatou que não houve efeitos colaterais nos participantes da investigação (COSTA; AGUIAR; NASCIMENTO, 2004). Um estudo realizado por Conde et al. (2011) demonstrou que seu extrato alcoólico foi eficaz em reduzir a intensidade e a frequência de dor de cabeça com poucos ou nenhum efeito colateral. O mesmo efeito constataram Carmona et al. (2013).

O extrato da erva-cidreira tem ação anticonvulsivante, no modelo de convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol, e na potencialização do efeito do diazepam, o que sugere envolvimento do sistema gabaérgico (receptor GABA). Dentre os componentes químicos dos óleos essenciais, o citral, o mirceno e o limoneno parecem atuar de maneira sinérgica, sendo seguramente os principais responsáveis pelos efeitos observados (BARBOSA, 2003).

Camundongos adultos foram previamente tratados por via oral (v.o.) com extrato aquoso, extrato hidroalcoólico ou fração butanólica, ou via intracerebroventricular (i.c.v.) com verbascosídeo (Figura 4); e 1 h (v.o.) ou 5 min. (i.c.v.) após, submetidos aos modelos: sono etéreo (SE), sono barbitúrico (SB), temperatura retal (TR), convulsões induzidas por pentilenotetrazol (CPTZ), labirinto em cruz elevado (LCE), *rota-rod* (RR), arame (AR) e suspensão pela cauda (TST); a fim de avaliar possíveis atividades sedativa, ansiolítica, anticonvulsivante e/ou antidepressiva. Sugeriu-se um efeito depressor central para a fração butanólica e o verbascosídeo extraído de *L. alba*, sendo que este último parece contribuir para o efeito central do primeiro, embora mais estudos sejam necessários para elucidar este efeito e a possível correlação entre os outros constituintes da fração e esta substância (CARVALHO, 2006).

Figura 4 – Estrutura química do verbascosídeo.



Fonte: Barbosa (2003).

A substância chamada verbascosídeo é um componente isolado de *L. alba*, o fenilpropanoide verbascosídeo [2-(3,4-dihidroxifeniletíl)-1-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -

D-(4-O-cafeil)-glucopiranosídeo], em que foram descritas atividades antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptiva (VERTUANI et al., 2011; BACKHOUSEA et al., 2008).

Andregretti-Frohner et al. (2005) estudaram a fração butanólica e acetato de etila, provenientes da extração líquido-líquido do macerado etanólico de *L. alba* e detectou atividade antiviral, contra o vírus Herpes simples tipo 1 resistente ao aciclovir e contra o vírus da pólio tipo 2, respectivamente. O *screening* fitoquímico realizado com o macerado etanólico detectou a presença de compostos fenólicos e flavonoides (VALE et al., 2002).

O isoverbacosídeo, isômero estrutural do verbacosídeo, foi isolado das folhas dos quimiotipos de *L. alba* existentes no Horto de Plantas Medicinais Prof. Francisco José de Abreu Matos, da UFC, em Fortaleza (SILVEIRA; PESSOA, 2005) e das folhas do exemplar de Guadalupe (HENNEBELLE et al. 2006).

Avaliação da atividade antinociceptiva dos extratos das folhas de *L. alba* quimiotipo II mostrou que a fração acetato de etila do extrato aquoso era a mais ativa. O isoverbacosídeo, componente principal desta fração, apresentou atividade antimicrobiana frente às bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* e *Candida albicans* (BARBOSA, 2003).

Um estudo feito por Blanco et al. (2013) demonstraram uma atividade antiespasmódica do extrato alcoólico de *L. alba*, validando seu uso tradicional de tinturas e infusões para o alívio de dores.

Matos (1996) estudando a produção da erva-cidreira no Estado do Ceará observou que as plantas com alta concentração de limoneno-carvona (quimiotipo III), apresentaram ação mucolítica, enquanto plantas com alta concentração de limoneno-citral (quimiotipo II), apresentaram ação sedativa, espasmolítica e ansiolítica. Folhas de erva cidreira do quimiotipo mirceno-citral (quimiotipo I) são utilizados como chás, apresentando propriedades calmantes e espasmolíticas suaves, em função do citral e analgésica devido a ação do mirceno (VALE et al., 2002).

4.5 *Melissa officinalis* L.

A melissa (*Melissa officinalis* L.) pertence à família Lamiaceae, é conhecida em nosso país por seus nomes populares como melissa, toronjil (espanhol), erva cidreira (português), "balm" ou "lemon balm" (inglês) (PETENATTI et al., 2014). Planta originária da região que circunda o Mediterrâneo e a Ásia. É do tipo arbustiva que pode atingir 20 a 80 cm de altura. Os caules, ramificados a partir da base, formam touceiras. As folhas são verde-intensas na parte superior e verde-claras na parte inferior. As flores, quando surgem, são brancas ou amareladas, podendo tornar-se rosadas com o passar do tempo. Toda a planta

emana um odor semelhante ao do limão, que se torna mais intenso depois que a planta seca (LAUNERT, 1989; REIS et al., 2009).

Tem sido incorporada em muitas farmacopeias e suas folhas são usadas por infusão ou decocção em chás aromáticos (BLUMENTHAL; GOLDBERG; BRINCKMANN, 2000). É uma planta medicinal amplamente estudada para a qual são descritos compostos como ácidos hidroxicinâmicos (rosmarínico, p-coumárico, clorogênico) e óleos essenciais, em que os principais constituintes são monoterpenos aromáticos, como o citral (mistura dos isômeros neral e geranial), mirceno, citronelal, linalol, timol, cânfora, além de mucilagem, taninos, saponinas e resinas (BLANK et al., 2006; ESQUIVEL; VARGAS, 2007). Outros compostos de interesse presentes nesta espécie são os flavonoides, como ácido rosmarínico (WHO, 2002; FECKA; TUREK, 2007). Para melissa, o óleo essencial apresenta em sua composição química o citral (neral + geranial) e citronelal como componentes majoritários (LUZ et al., 2014).

Várias atividades biológicas tem sido descritas para *Melissa officinalis* L. como antioxidante (MIMICA-DUKIC et al., 2004), inibidora do crescimento de células do câncer (ENCALADA et al., 2011), anti-obesidade (LEE et al., 2008), ansiolítica (KENNEDY et al., 2006) e antidepressiva (SHIH et al., 2015), carminativa, atividade antibacteriana e antiviral e indicada no tratamento de espasmos gastrointestinais (SIMON; KERRY., 2000; SORENSEN, 2000).

M. officinalis pode modular várias medidas de comportamento, como um moderado efeito sedativo, no transtorno do sono, na atenuação de sintomas de desordens nervosas, inclusive a redução de excitabilidade, ansiedade e tensão. Pesquisas reportam a importância do citral no óleo essencial, modulando estas atividades (KENNEDY et al., 2003; SADRAEI; GHANNADI; MALEKSHAHI, 2003; TAIWO, 2007).

4.3 *Cymbopogon citratus*

O capim santo, espécie *Cymbopogon citratus*, pertence à família Poaceae. Originário da Índia e amplamente distribuído por todo o globo em zonas tropicais (NEGRELLE; GOMES, 2007) entre eles o Brasil. É popularmente conhecido como capim-cidreira, erva-cidreira, capim-santo, capim-de-cheiro, citronela, capim-catinga, patchuli, capim-marinho, capim-memeca e capim-citronela (LORENZI; MATOS, 2008).

É uma gramínea perene, ereta, medindo 0,6 até 3 m de altura, com caule rizomático muito ramificado. São alternas, planas, eretas, ásperas e aromáticas com odor de limão. A lâmina foliar é glabra, com bainha larga e aberta. A nervação é paralela, sendo a nervura

mediana evidente e estriada. A margem é hispida, possuindo tricomas rígidos e cortantes (DUARTE; ZANETI, 2004).

Entre as várias substâncias isoladas e identificadas a partir das folhas e raízes de capim-santo, encontram-se alcaloides, saponinas, sitosterol, terpenos, álcoois, cetona, flavonoides, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido p-cumárico e açúcares (BARBOSA et al., 2008). O principal constituinte químico do óleo essencial do capim-santo é o citral (40% - 80%), que é grande de interesse para as indústrias farmacêuticas e de cosméticos (NASCIMENTO et al., 2003; LORENZI; MATOS, 2008).

O chá de suas folhas é utilizado popularmente no Brasil como antiespasmódico, analgésico, anti-inflamatório, antipirético, diurético e sedativo (CARLINI et al., 1986; ANDRADE; ZOGHBI; LIMA, 2009). Atualmente o óleo essencial de capim-limão tem sido foco de estudos no combate ao câncer e AIDS (PUATANACHOKCHAI et al., 2002; WRIGHT; MAREE; SIBANYONI, 2009).

É empregado como anti-séptico, aromatizante de ambiente e, principalmente, como material de partida para síntese da Vitamina A (LORENZI; MATOS, 2008). Outras atividades do óleo essencial de *C. citratus* constatadas foram antimicrobiana, antifúngica, repelente de insetos e antioxidativa (VELLUTI et al., 2004; KHADRI et al., 2010; SINGH et al., 2010; SHAH et al., 2011).

4.4 Benzodiazepínicos

Os benzodiazepínicos (BZDs), introduzidos na terapêutica na década de 1960, são fármacos depressores do Sistema Nervoso Central (SNC), utilizados como hipnóticos, ansiolíticos, anticonvulsivantes e miorrelaxantes (SWEETMAN, 2005). São utilizados principalmente como ansiolíticos hipnóticos e para o tratamento do transtorno de pânico, das fobias e dos quadros de agitação associados a outras condições psicóticas. São as substâncias de escolha para o manejo da ansiedade e da agitação aguda (CARVALHO; COSTA; FAGUNDES, 2006).

Possuem receptores específicos no SNC, ligados à receptores gabaérgicos tipo A (GABA-A), com os quais regula a abertura e o fechamento dos canais de íons cloreto, responsáveis pela propagação dos estímulos para os neurônios pós-sinápticos. A ação deles e do GABA inibe diversos sistemas de neurotransmissão, funcionando como um depressor do SNC (BRASIL, 2007). Os BZDs seriam, assim, agonistas deste sistema agindo nos receptores gabaminérgicos.

Quando, devido às tensões do dia-a-dia ou por causas mais sérias, determinadas áreas do cérebro funcionam exageradamente, resultando num estado de ansiedade, os BZDs exercem um efeito contrário, isto é, inibem os mecanismos que estavam hiperfuncionando e o paciente fica mais tranquilo menos responsivo aos estímulos externos, como consequência desta ação, os ansiolíticos produzem uma depressão da atividade do cérebro que se caracteriza por diminuição da ansiedade, indução do sono, relaxamento muscular e redução do estado de alerta (FORSAN, 2010).

4.4.1 Efeito colateral e uso abusivo dos BZDs

Os principais efeitos colaterais dos BZDs, em relação a outras classes de psicotrópicos, como os barbitúricos, tem menor potencialidade aos acidentes fatais e menos tendência a produzir tolerância farmacológica (CARVALHO; DIMENSTEIN, 2004). São considerados sintomas moderados e transitórios, surgindo em decorrência da dose diária elevada ou da sensibilidade individual.

No entanto, não exclui a possibilidade da ocorrência de sintomas como sonolência, hipotonia muscular, amnésia, sensação de embriagamento, diminuição de cognição, fadiga, cefaleia, vertigens, aumento do risco de acidentes e constipação. Tem sido descritas reações paradoxais como excitação aguda, ansiedade, distúrbios do sono e alucinações (SOUSA; OPALEYE; NOTO, 2013). O fenômeno de dependência aos benzodiazepínicos está relacionado com a farmacocinética, como a alta lipossolubilidade e capacidade de se distribuir pelo tecido cerebral, a meia-vida biológica e os seus efeitos cumulativos (OGA, 2008).

Uma problemática encontrada na terapia com BZDs é o tratamento prolongado, diga-se, de 4 a 36 meses em uso dessa classe de medicamentos. Existe uma média em que cada clínico teria por volta de 50 pacientes dependentes de benzodiazepínicos, e que destes, 50% desejam descontinuar o uso (NASTASY; RIBEIRO; MARQUES, 2008). Esse uso excessivo é observado em diversos países, independentemente do grau de desenvolvimento econômico, tanto em centros urbanos como em populações rurais (FIRMINO et al., 2011). O primeiro levantamento domiciliar realizado no Brasil referiu o uso dos benzodiazepínicos sem receita médica por 3,3% dos entrevistados (FIRMINO et al., 2012)

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAL

5.1.1 Colheita do material botânico

As folhas da planta adulta de *Lippia alba*, quimiotipo II, foram coletadas no horto de

plantas medicinais Francisco José de Abreu Matos. A exsicata foi registrada no Herbário Prisco Bezerra da UFC com o número 38.174. As folhas foram coletadas em novembro de 2015 e março de 2016, às 9h, conforme horário estabelecido por Barbosa (2003).

5.1.2 Solventes e reagentes

FAA (folmaldeído ácido acético 70%; Solução de álcool etílico 70%), hipoclorito de sódio 20%, Reagente azul de toluidina, diclorometano, hexano, acetato de etila, etanol vanilina sulfúrica, éter etílico, acetona, Revelador universal (ácido sulfúrico:etanol 10:90), metanol.

5.1.3 Equipamentos

Aparelho de estufa de dessecação com circulação de ar Olidef CZ; Espectrômetros Bruker modelos Avance DPX-300 e Avance DRX-500; Micrótopo Leica 2065; Microscópio equipado com polarizador modelo Leica DM4000 B LED; Analisador de umidade por infravermelho – IV 2500 marca GEHAKA; Cromatógrafo Gasoso Shimadzu GCMS QP2010s; Balança analítica Shimadzu AUY220, Forno mufla Linn Elektro Therm modelo 06567 Bad Frankenhausen Kyfth.

5.2 MÉTODOS

A parte experimental deste trabalho está estruturada em quatro etapas: Etapa I: estudos preliminares; Etapa II: caracterização morfoanatômica das folhas; Etapa III: avaliação da composição química do óleo essencial do banco de germoplasma do horto Francisco José de Abreu Matos; Etapa IV: desenvolvimento de técnicas de preparação da droga vegetal; Etapa V: obtenção do marcador químico analítico.

As atividades foram desenvolvidas no Laboratório de Produtos Naturais da UFC, com o apoio do Projeto Farmácias Vivas, do Núcleo de Fitoterápicos (NUFITO), do Departamento de Botânica e do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN).

ETAPA I: ESTUDOS PRELIMINARES

5.2.1 Abordagem fitoquímica: prospecção preliminar dos constituintes químicos

Esta prospecção química preliminar foi realizada nas amostras constituídas por folhas dessecadas, de acordo com as técnicas descritas por Matos (2009). Foram pesquisados os seguintes constituintes químicos: alcaloides, antocianidinas, antocianinas, antranóis, auronas, bases quaternárias, catequinas, chalconas, cumarinas, esteroides, fenóis livres, flavonoides, heterosídeos cianogenéticos, leucoantocianidinas, resinas, heterosídeos

saponínicos, taninos condensados, taninos pirogálicos, triterpenóides e xantonas. Para detectar a presença de óleo essencial foi utilizada a técnica de arraste à vapor descrita no item 5.2.9.2.

5.2.2 Determinação da perda por dessecação da droga

A determinação de substância volátil na droga vegetal, obtida por meio de dessecação à sombra conforme item 5.2.8, foi realizada através do método de balança por infravermelho, utilizando um analisador de umidade por infravermelho a 105°C, como descrito na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). As análises foram realizadas em triplicata.

5.2.3 Determinação do teor de cinzas

A determinação de cinzas totais foi realizada conforme as técnicas descritas na Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010). As análises foram realizadas em triplicatas na droga obtida por dessecação à sombra conforme item 5.2.8.

ETAPA II: CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA DAS FOLHAS E DA DROGA VEGETAL DE *L. ALBA*

5.2.4 Análise morfológica

Foi realizada na droga vegetal, constituída de folhas inteiras, com vista desarmada e com auxílio de lupa, incluindo caracteres organolépticos (OLIVEIRA; AKISSUE, 1993). Foi utilizado como suporte bibliográfico para a caracterização morfológica, Vidal e Vidal (2006).

5.2.5 Análise anatômica

Foram realizados cortes histológicos transversais das folhas, os quais foram fixados em formaldeído ácido acético (FAA) 70% por 48 horas e posteriormente, armazenadas em álcool 70%. Foram confeccionadas lâminas semipermanentes. As lâminas semi-permanentes foram montadas mediante secções de cinco micrometros (μm), obtidas em micrótomo Leica 2065, montadas em lâminas histológicas, clarificadas em hipoclorito de sódio 20%, após lavadas em água destilada, banhadas em água acidulada e novamente em água destilada. Foram realizados dois tipos de reações histoquímicas: coloração com azul de toluidina 0,12% e SUDAN III. O meio de montagem utilizado foi gelatina glicerinada 40% e na vedação, esmalte sintético incolor. As ilustrações foram feitas através de fotomicrografias, utilizando microscópio óptico Leica DM 4000B Led com sistema de captura de imagem (OLIVEIRA; AKISSUE, 1993; SANTOS; INNECO; SOARES, 2004).

5.2.6 Análise anatômica da droga pulverizada

Obteve-se a droga por dessecação à sombra, conforme item 5.2.8. Esta foi pulverizada com auxílio de moinho de facas e tamisada. O pó teve granulometria de 500 µm, em torno de 30%, sendo tratado com SUDAN III (OLIVEIRA; AKISSUE, 1993).

ETAPA III: AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *L. ALBA* QUIMIOTIPO II DO BANCO DE GERMOPLASMA DO HORTO FRANCISCO JOSÉ DE ABREU MATOS (UFC).

5.2.7 Avaliação do banco de germoplasma

O Horto de plantas medicinais prof. FJAM é considerado um dos únicos bancos de germoplasma do Brasil cujos caracteres genéticos das plantas vem sendo conservado ao longo dos anos por meio de propagação vegetativa. Entre estas plantas podemos destacar a *L. alba*, quimiotipo II.

Para comparar a conservação desse banco de germoplasma referente à citada espécie, buscou-se no acervo científico do prof. FJAM, no banco de dados de óleos essenciais, os cromatogramas obtidos por CG/EM registrados nas seguintes datas: maio de 1988, setembro de 1995, janeiro de 1996 e março de 2002. Estes cromatogramas foram comparados aos obtidos no presente trabalho, em novembro de 2015 e março de 2016, tendo em vista os teores de citral (neral e geranial) e limoneno.

ETAPA IV: DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DA DROGA DE VEGETAL COM MONITORAMENTO DO TEOR DE UMIDADE E DO MARCADOR QUÍMICO ATIVO (CITRAL).

5.2.8 Desenvolvimento de técnicas de dessecação das folhas de *Lippia alba* com determinação dos teores de umidade e de óleo essencial

Logo após a colheita das folhas, conforme descrito no item 5.1.1, foi realizado um estudo comparativo para selecionar a melhor técnica de dessecação, objetivando eleger a mais viável técnica de dessecação para obtenção da droga com o maior rendimento de óleo essencial (citral). Para atingir este objetivo, as folhas frescas foram colocadas para dessecar à sombra com auxílio de desumidificador, em temperatura ambiente por um período de cinco dias, e em estufa de dessecação a temperatura de 40°C por um período de 12 horas.

5.2.9 Seleção do método de extração do óleo essencial

A extração do óleo essencial de *Lippia alba*, quimiotipo II, foi realizada por meio de duas técnicas: coobação e arraste a vapor. Entre estas técnicas foi selecionada a que conduziu a um maior rendimento de óleo essencial.

Os óleos essenciais obtidos foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia gasosa (CG/EM) como parâmetros de qualidade para esses marcadores químicos ativos, citral e limoneno.

5.2.9.1 Coobação

As folhas frescas, dessecadas à sombra e em estufa foram trituradas (1 Kg) e colocadas separadamente em um extrator de óleo essencial, aparelho de Clevenger, durante duas horas. O óleo essencial foi separado do destilado, logo após tratado com sulfato de sódio anidro e analisado por CG/EM, conforme descrito no item 5.2.11. Em seguida, foi analisado o peso do óleo essencial em balança analítica para o cálculo do rendimento.

5.2.9.2 Arraste direto por vapor d'água

As folhas frescas, dessecadas à sombra e em estufa foram trituradas (1 Kg), e colocadas separadamente em frasco acoplado a um condensador e a uma fonte geradora de vapor d'água para extração do óleo essencial por arraste de vapor. Finalizada a operação, o óleo essencial foi tratado com sulfato de sódio anidro e analisado por CG/EM, conforme descrito no item 5.2.11.

5.2.10 Determinação do perfil cromatográfico por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) do óleo essencial

Foi determinado o perfil cromatográfico dos óleos essenciais obtidos por meio das técnicas de coobação, arraste a vapor e do extrato etanólico 20%, a partir das folhas frescas utilizando o seguinte sistema cromatográfico: placa de sílica; eluente diclorometano : hexano (7:3); revelador vanilina sulfúrica. O extrato etanólico 20% foi obtido a partir das folhas dessecadas à sombra por meio de maceração a frio em etanol durante sete dias.

5.2.11 Análise do óleo essencial por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)

A análise dos óleos essenciais foi realizada por CG-EM acoplado a um analisador de dados informatizado. Os constituintes foram identificados utilizando-se Índices Kowats

como pré-seleção e interpretação dos respectivos espectros de massas. As confirmações foram feitas através de comparação visual dos registros das fragmentações (m/z) com padrões da literatura (ALENCAR; CRAVEIRO; MATOS, 1984; BARBOSA, 2003).

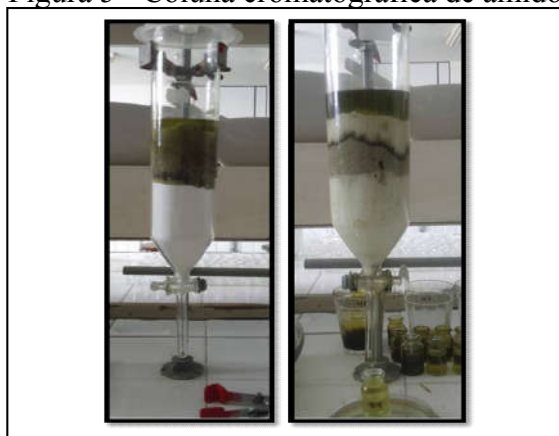
ETAPA V: OBTENÇÃO DE MARCADOR QUÍMICO ANALÍTICO NÃO -VOLÁTIL DE *Lippia alba*, QUIMIOTIPO II.

5.2.12 Purificação e isolamento dos constituintes químicos do extrato etanólico

5.2.12.1 Cromatografia em Coluna de Amido (CCA)

Para preparação da coluna foram suspensos 2 g do extrato etanólico seco à temperatura ambiente em 3 mL de éter etílico. Para a preparação da amostra, em um gral contendo aproximadamente 3 g de amido, foi acrescentada essa suspensão e com ajuda do pistilo a mistura foi homogeneizada para adsorção no amido, sendo o solvente eliminado a temperatura ambiente. Em seguida, 40 g de amido foram colocados em uma coluna cromatográfica de 5 cm de diâmetro com hexano (Figura 5).

Figura 5 - Coluna cromatográfica de amido.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A eluição foi realizada com crescentes gradientes de polaridades de solventes, a saber, hexano, diclorometano e acetato de etila. As 35 frações obtidas (50 mL cada) foram analisadas através de CCD de sílica, eluente diclorometano: acetona 7:3 v/v; revelação em câmara de radiação UV-visível para identificação de faixas fluorescentes e em seguida, com revelador universal (ácido sulfúrico/etanol a 10%), seguida de aquecimento em estufa. Foram reunidas, codificadas e pesadas aquelas que apresentaram o mesmo comportamento cromatográfico (BANDEIRA, 2002)

5.2.12.2 Isolamento por Cromatografia de Exclusão Molecular (CEM)

As frações obtidas da seção anterior foram purificadas por cromatografia de exclusão molecular realizada em coluna de pequeno diâmetro com sephadex. Metanol foi utilizado como eluente. As frações obtidas foram reunidas, codificadas e pesadas as que apresentaram o mesmo comportamento cromatográfico (BANDEIRA, 2002).

5.2.12.3 Obtenção do marcador químico analítico

Obteve-se o espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN ^1H) da fração isolada e purificada na seção anterior em espectrofotômetro (Brucker), operando na frequência de hidrogênio a 500 MHz, sendo essa substância denominada de marcador químico analítico.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

ETAPA I: ESTUDOS PRELIMINARES

6.1 Abordagem fitoquímica: prospecção preliminar dos constituintes químicos

A abordagem fitoquímica demonstrou a presença de esteroides, fenóis livres, flavonóides, saponinas, taninos condensados e triterpenoides em que Félix-Silva et al (2012) e Gomes et al (2016) também avaliaram a presença destes compostos. Os resultados estão apresentados na Tabela 1. A presença de óleo essencial foi detectada através da extração com arraste a vapor.

Tabela 1 - Prospecção dos constituintes químicos presentes nas folhas de *Lippia alba* quimiotipo II.

Testes	Resultados	Testes	Resultados
Alcalóides	0	Chalconas	0
Antocianidinas	0	Cumarinas	0
Antocianinas	0	Esteroides	+
Antranóis	0	Fenóis livres	+
Auronas	0	Flavonoides	+
Bases quaternárias	0	Heterosídeos cianogénicos	0
Catequinas	0	Leucoantocianidinas	0
Taninos pirogálicos	0	Resinas	0
Triterpenoides	+	Saponinas	+
Xantonas	0	Taninos condensados	+
Óleo essencial	+		

Fonte: elaborado pelo autor. (0) negativo; (+) positivo.

6.2. Determinação da perda por dessecação das folhas

De acordo com a análise realizada, obteve-se o teor médio de 12,2% de perda por dessecação em relação à droga vegetal (Tabela 2). O teor médio obtido na folha fresca foi de 71,8% \pm 1,85 (DP), na Droga 1 (folhas desseccadas à sombra) de 12,2% \pm 0,65 (DP) e na Droga 2 (folhas desseccadas em estufa) de 9,8% \pm 0,40 (DP).

Tabela 2 - Resultados para a determinação de perda por dessecação com seus respectivos desvios-padrão.

Amostras	Folhas frescas	Droga 1	Droga 2
1	70,1	12,2	10,3
2	71,7	11,6	9,8
3	73,8	12,9	9,5
Teor médio (%)	71,8 \pm 1,85	12,2 \pm 0,65	9,8 \pm 0,40

Fonte: elaborado pelo autor. Droga 1: folhas desseccadas à sombra; Droga 2: folhas desseccadas em estufa. DP:Desvio-padrão.

Segundo Oliveira e Akissue (1993), a porcentagem de umidade na folha fresca é de 60 a 98%, sendo que a umidade permitida na droga é de 8 a 14%. Nesse contexto, pode-se observar do ponto de vista de umidade que tanto a Droga 1, obtida por dessecação à sombra, como a Droga 2, obtida por dessecação em estufa com circulação de ar, estão dentro das especificações de qualidade. Conforme a Farmacopeia Brasileira (2010), o parâmetro perda por dessecação determina a perda de substâncias voláteis. Portanto, esses valores demonstrados na Tabela 2 podem ser considerados tanto a perda de água circulante quanto a de óleo essencial.

O teor de água na droga é importante para a sua conservação. Quanto maior for este teor, mais sujeita aos agentes deletérios a droga fica (OLIVEIRA; AKISSUE, 1993).

6.3 Determinação do teor de cinzas

A incineração de drogas leva à formação de resíduo cujo peso percentual deve ficar entre determinados limites. O teor médio obtido foi de 3,7% \pm 0,52 (DP). Quando uma droga é adulterada, a porcentagem de cinzas varia. Esta determinação é muito mais importante na identificação de drogas pulverizadas, que podem ser adulteradas pela adição de areia. Neste caso, o teor de cinzas vai aparecer aumentado (OLIVEIRA; AKISSUE, 1993).

ETAPA II: ANÁLISE MORFOANATÔMICA

6.4 Caracterização morfoanatômica

As folhas de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown, quimiotipo II, possuem as seguintes características macroscópicas: oval com bordos serrados, peninérvea, completa, com base foliar atenuada e simétrica, curtamente peciolada com ápice agudo (VIDAL; VIDAL, 2006). Estão dispostas de maneira oposta sobre o caule, com composição do tipo compostas – parimpenadas. A inserção do pecíolo foliar apresenta-se de forma lateral e reta. Possuem como características organolépticas aroma cítrico, sabor adocicado. A folha fresca apresenta textura macia. No entanto, a droga vegetal apresenta superfície áspera, levemente rugosa e consistência papirácea.

Figura 6 – Morfologia da folha fresca e da droga vegetal de *L. alba* quimiotipo II.



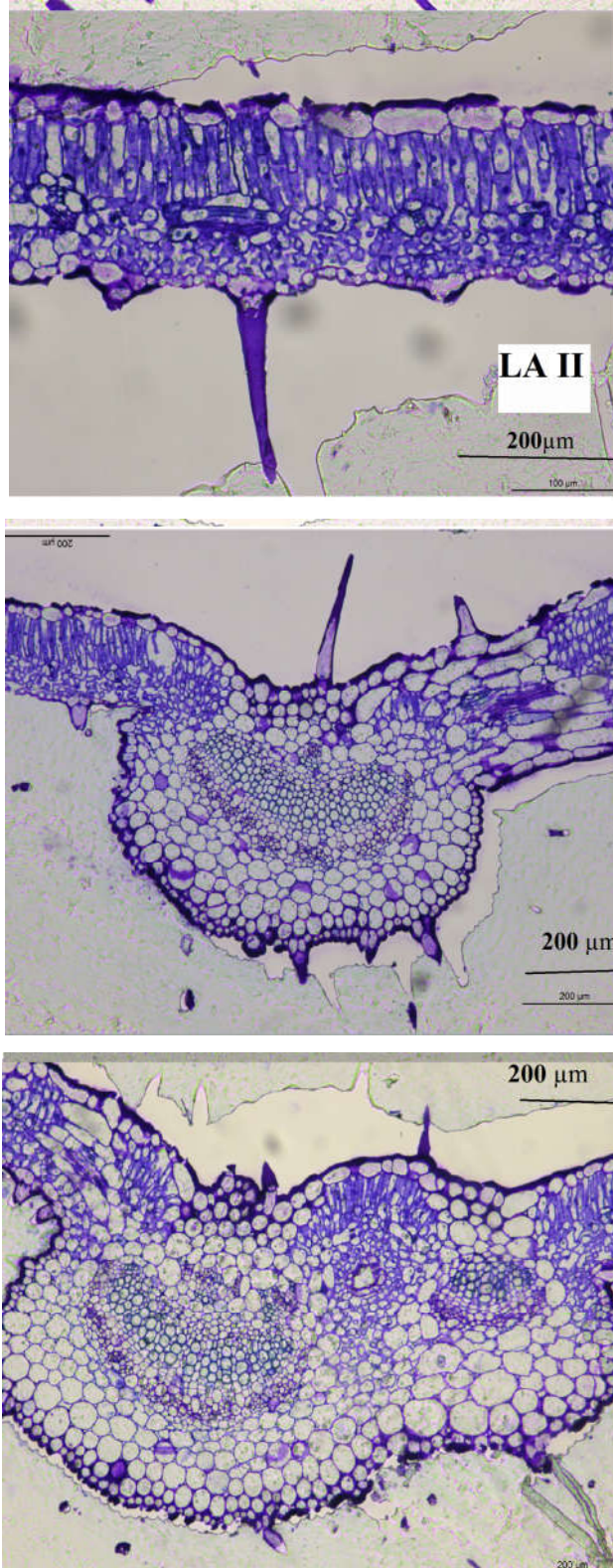
Fonte: elaborado pelo autor. Aumento de 1x.

As folhas caracterizam-se por apresentarem epidermes superior e inferior unicelulares, revestidas por cutículas relativamente espessas, mesófilo heterogêneo e assimétrico formado por parênquima paliádico uni ou biestratificado, três ou quatro camadas de parênquima lacunoso (Figura 7). O azul de toluidina cora as fibras de lignina da parede de celulose em azul. As paredes da cutícula, conteúdos celulares de óleo fixo, óleo essencial, resinas, e outras substâncias de natureza lipofílica coram-se amarelo-alaranjado ou vermelho-alaranjado com SUDAN III (OLIVEIRA; AKISSUE, 1993).

Os tricomas (pêlos) glandulares são secretores de óleo essencial, evidenciados por SUDAN III, como podem ser observados na Figura 7. Observam-se também tricomas tectores longos unicelulares. Os tricomas glandulares e tectores unicelulares longos estão presentes na epiderme inferior, enquanto na epiderme superior existem apenas tricomas tectores unicelulares longos (Figura 7), conforme Félix-Silva et al (2012). Essas

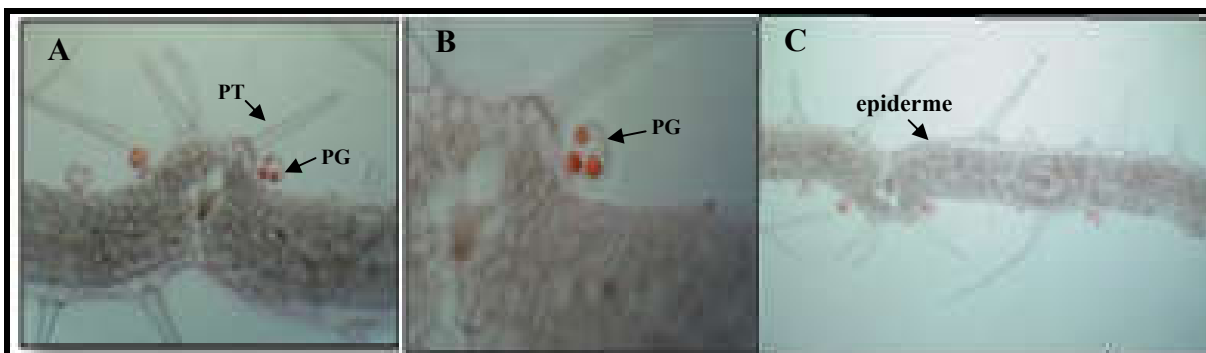
características também foram encontradas por Tavares, Momenté e Nascimento (2011).

Figura 7 – Fotomicrografia de corte transversal da anatomia das folhas de *L. alba* quimiotipo II (LAII).



Fonte: elaborado pelo autor. Estruturas foliares de LAII em aumento de 20x coradas com azul de toluidina.

Figura 8 – Fotomicrografias de corte transversal das folhas de *L. alba*, quimiotipo II, tratado com SUDAN III.

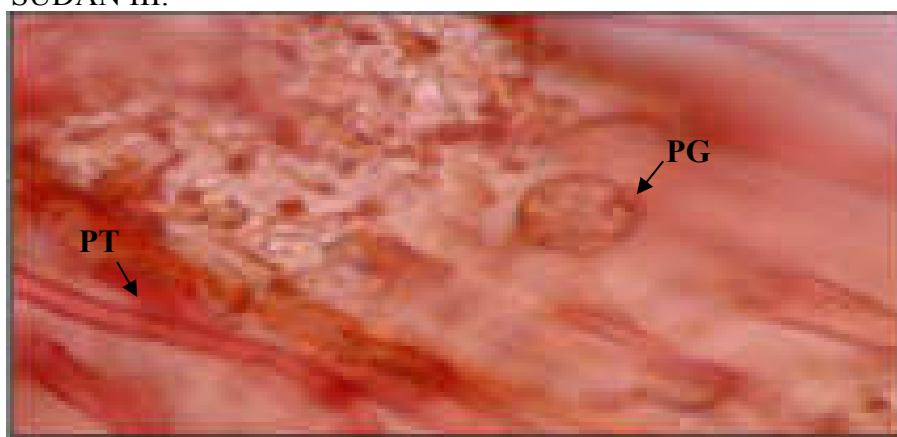


Fonte: elaborado pelo autor. A: Tricomas tectores(PT) e glandulares(PG); B: Tricoma glandular; C: Epiderme com tricoma tectores longos unicelulares e glandulares.

O pó possui odor forte ligeiramente cítrico de sabor adocicado e de cor verde. A análise microscópica da droga pulverizada, demonstrou presença de tricomas glandulares e tectores na epiderma foliar, evidenciado por SUDAN III (Figura 9).

O pó das folhas dessecadas mantém as características estruturais microscópicas originais da planta em estudo, demonstrando que mesmo com a moagem das folhas secas, conseguiu-se observar as estruturas secretoras de óleo essencial, tricomas glandulares.

Figura 9 – Fotomicrografia da droga pulverizada corada com SUDAN III.



Fonte: elaborado pelo autor. PT: tricomas tectores. PG: tricoma glandular.

ETAPA III: AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *L. ALBA*, QUIMIOTIPO II, DO BANCO DE GERMOPLASMA DO HORTO F. J. A. M.

6.5 Avaliação do banco de germoplasma

A análise por CG/EM do óleo essencial das folhas de *L. alba*, coletadas em

março/2016, às 9 h, permitiu a identificação de vinte constituintes químicos apresentados na Tabela 3, com seus respectivos tempos de retenção (Tr) e porcentagens (%).

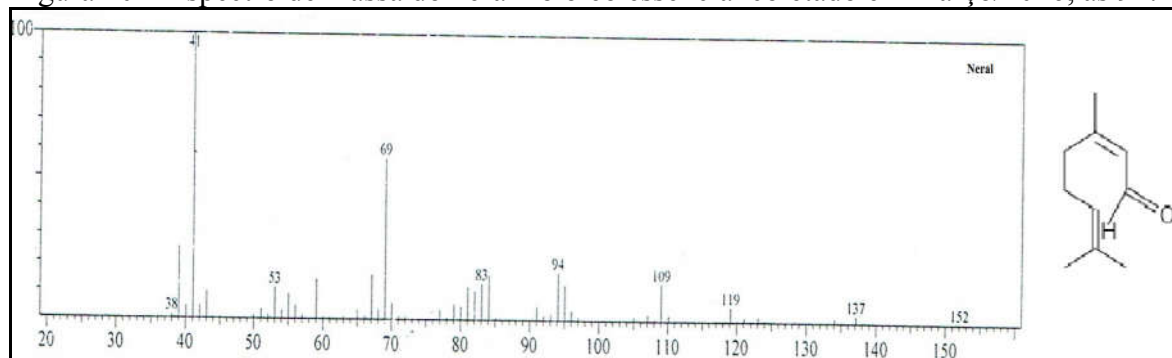
Tabela 3 – Composição química do óleo essencial de folhas de *L. alba*, quimiotipo II, coletadas em março/2016, às 9 h.

Nº	Componentes	TR (min)	%
1	Sabineno	14.556	0.66
2	6-metil-5-hepten-2-ona	15.166	0.73
3	p-cimeno	17.517	2.85
4	Limoneno	17.835	10.05
5	γ -Terpineno	19.555	2.19
6	Linalol	21.908	0.90
7	β -copaeno	25.831	1.46
8	Óxido de linalol	26.923	1.99
9	α -Copaeno	29.724	0.88
10	Neral (<i>cis</i> -citral)	30.751	28.79
11	Naftaleno	30.949	2.48
12	Geranial (<i>trans</i> -citral)	32.511	39.60
13	Nerol	33.426	0.54
14	Germacreno	44.902	2.18
15	γ -muuroleno	46.391	0.49
16	Elemol	47.187	1.31
17	Nerolidol	47.320	0.79
18	Óxido de cariofileno	47.929	0.56
19	Guaiol	48.067	0.56
20	β -Eudesmol	48.847	0.98

Fonte: elaborado pelo autor. Tr: Tempo de retenção em minutos; Porcentagem (%).

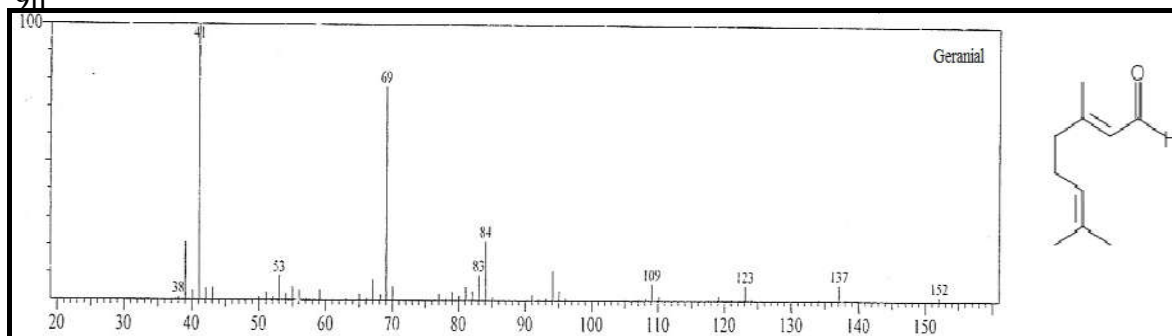
O cromatograma do óleo essencial obtido em março de 2016 (Figura 13), correspondente à última coleta juntamente com os espectros de massa de neral, geranial e limoneno (Figuras 10, 11 e 12), respectivamente, serviram como parâmetros de comparação do perfil cromatográfico e de fragmentação dos constituintes neral, geranial e limoneno.

Figura 10 – Espectro de massa do neral no óleo essencial coletado em março/2016, às 9h.



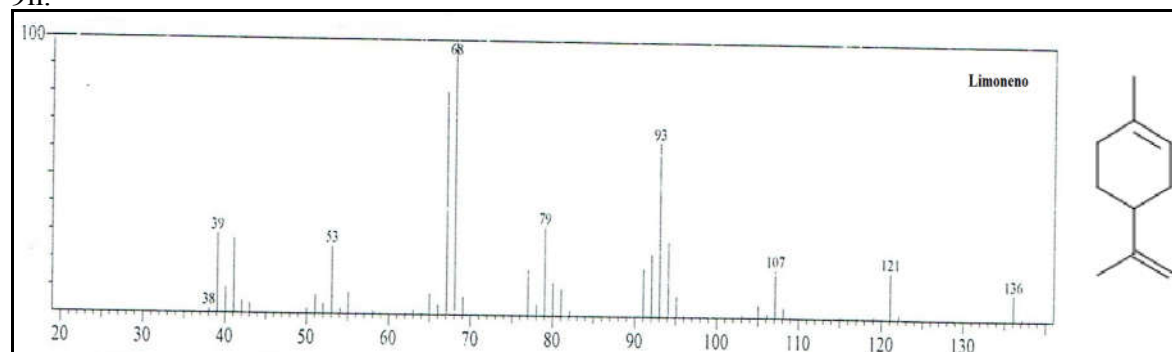
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 11 – Espectro de massa do geranial no óleo essencial coletado em março/2016, às 9h



Fonte: elaborado pelo autor.

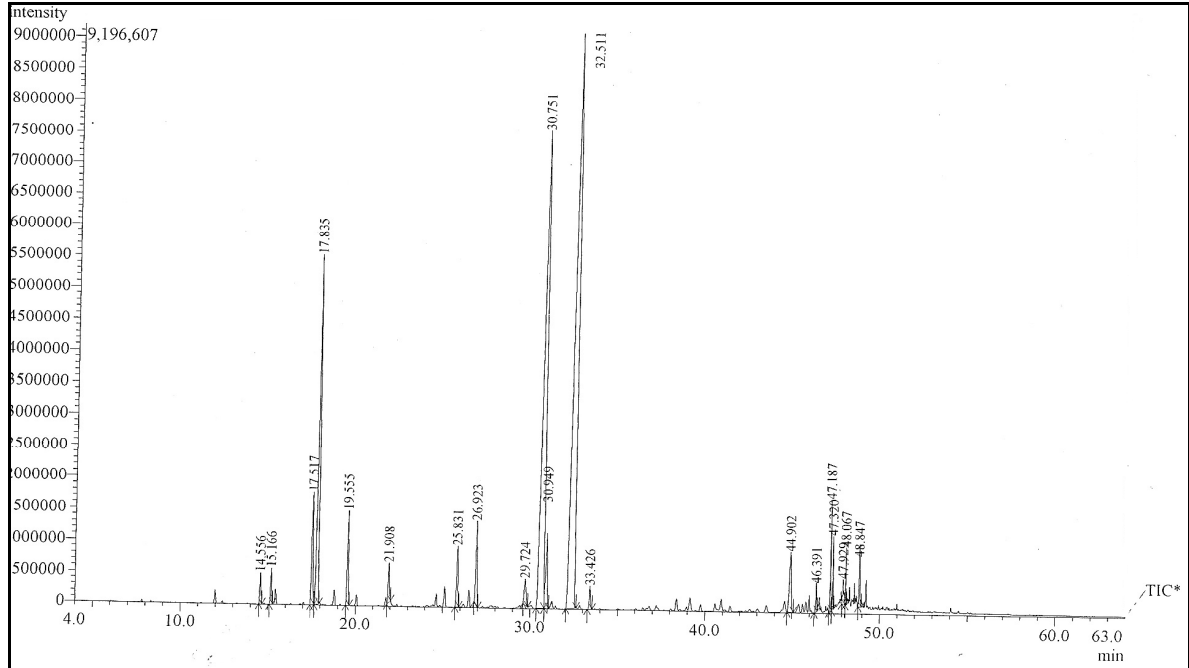
Figura 12 – Espectro de massa do limoneno no óleo essencial coletado em março/2016, às 9h.



Fonte: elaborado pelo autor.

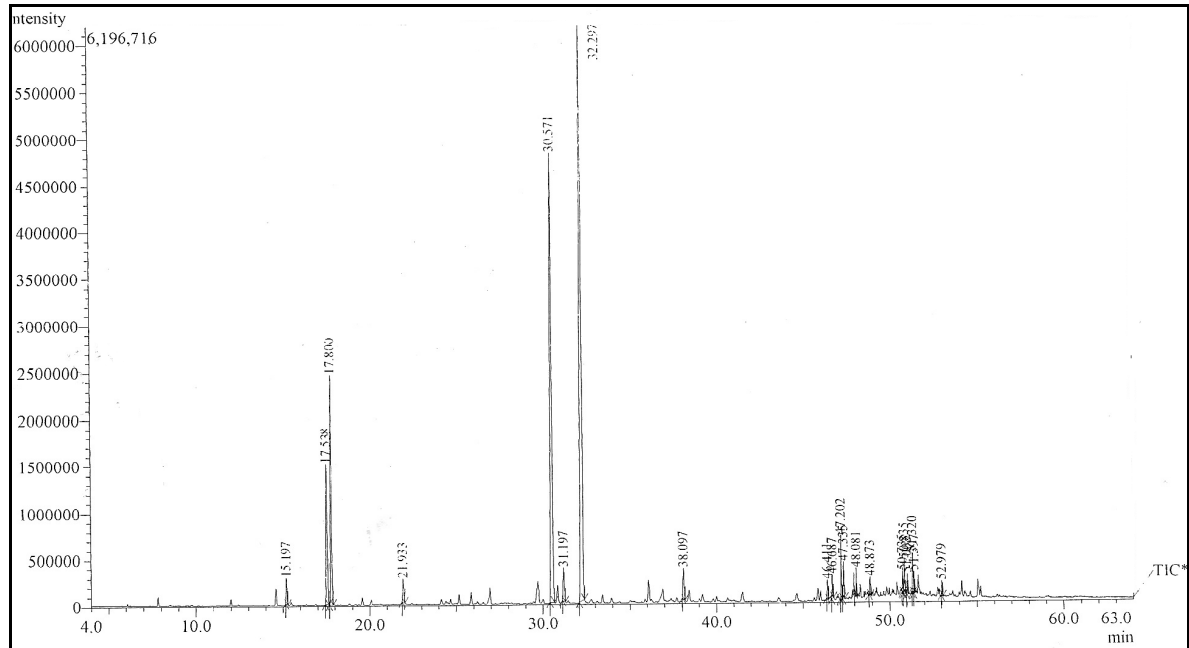
Assim, observou-se que os cromatogramas dos óleos essenciais de *L. alba* do banco de germoplasma de anos anteriores apresentaram as mesmas características quanto ao perfil cromatográfico (Figuras 13, 14, 15, 16, 17 e 18) e perfil de fragmentação de neral, geranial e limoneno.

Figura 13 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *L. alba* analisado em março/2016.



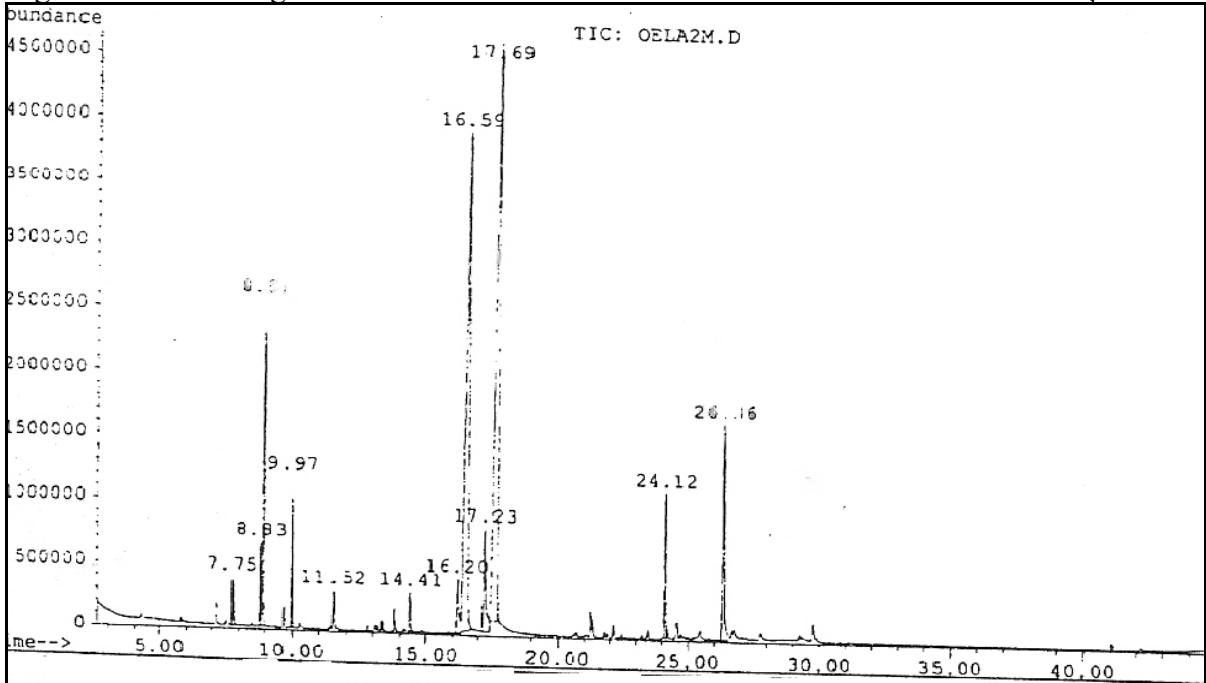
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 14 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *L. alba* analisado em novembro/2015.



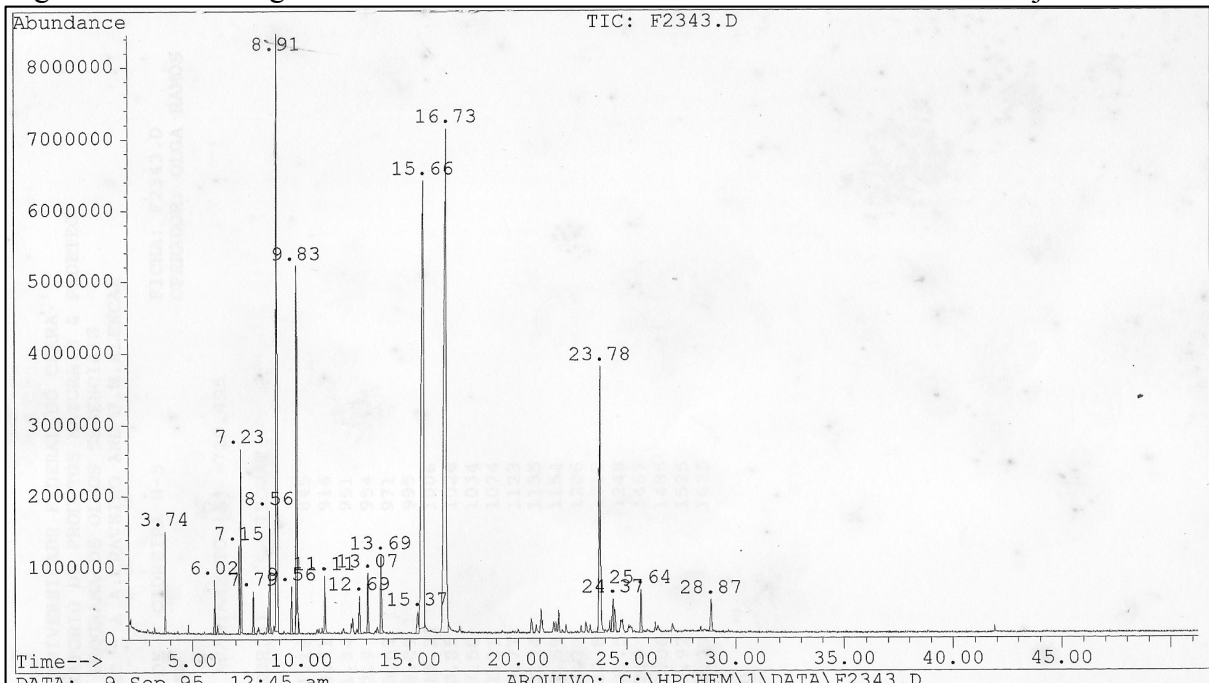
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 15 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *L. alba* analisado em março/2002.



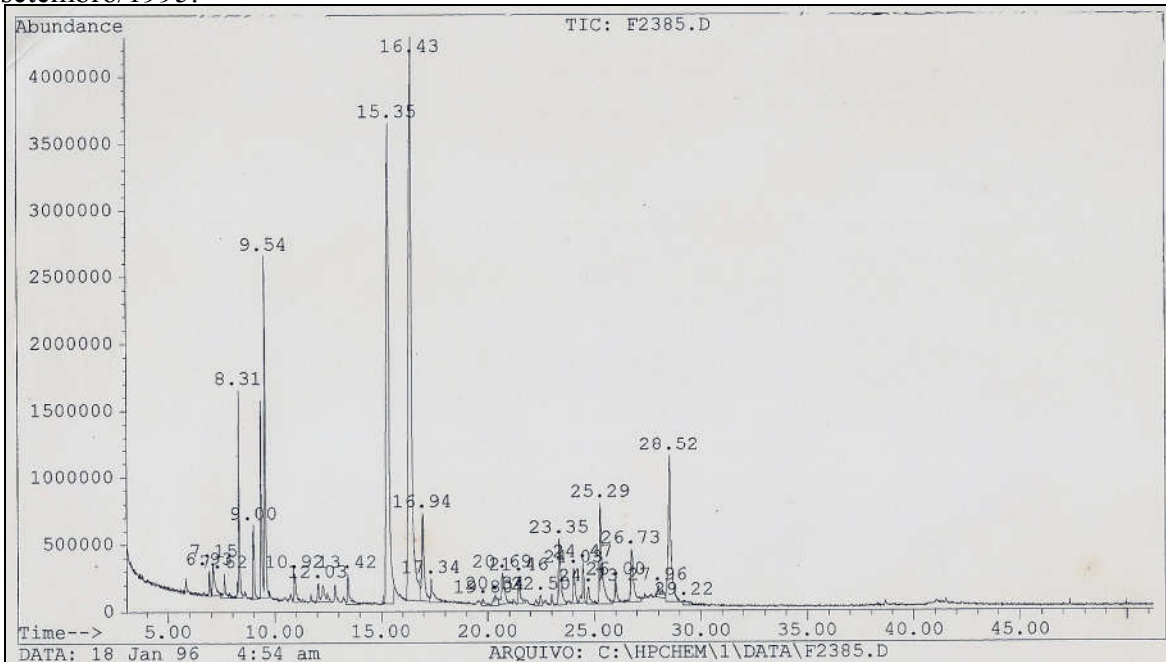
Fonte: Barbosa, 2003.

Figura 16 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *L. alba* analisado em janeiro/1996.



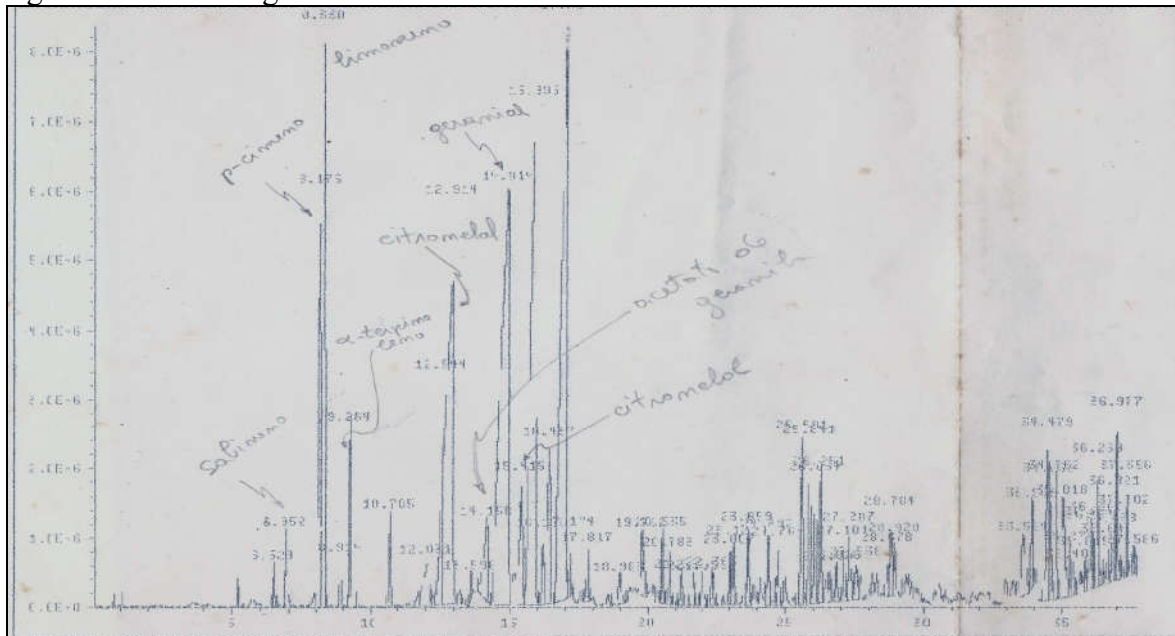
Fonte: acervo científico do horto F. J.A. M.

Figura 17 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *L. alba* analisado em setembro/1995.



Fonte: acervo científico do horto F.J.A.M.

Figura 18 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *L. alba* analisado em maio/1988.



Fonte: acervo científico do horto F.J.A.M.

A Tabela 4 demonstra os teores de neral e geranial (citrál) e limoneno ao longo dos anos: 1988, 1995, 1996, 2002, 2015 e 2016. Observou-se um aumento significativo de citral.

Tabela 4 - Teores de neral, geranial e limoneno nos óleos essenciais extraídos por arraste à vapor nos períodos de março/ 2016, novembro/ 2015, março/ 2002, janeiro/ 1996, setembro/ 1995 e maio/ 1988, obtidos a partir das folhas coletadas no horto FJAM.

Data da coleta	%Neral	%Geranial	%Limoneno
Mar/2016	28,79	39,60	10,05
Nov/2015	28,40	40,37	10,74
Mar/2002	29,25	37,95	6,94
Jan/1996	21,27	29,60	9,73
Set/1995	22,81	28,50	15,21
Mai/1988	9,81	15,45	4,91

Fonte: elaborado pelo autor.

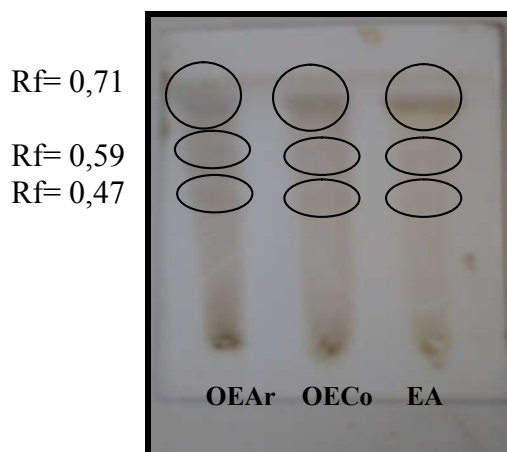
A adubação não é fator influenciador na mudança da produção do óleo essencial de *L. alba*, variável já verificada por Santos, Fernandes e Inneco (2006) afirmam que a adubação não influencia significativamente nas produções de matéria seca foliar e de óleo essencial. No entanto, conforme Martínez, Bernal e Cáceres (2000), o número de cortes por ano influencia na composição de óleo essencial, ocorrência que pode observada na Tabela 4 em que os valores de neral (9,81), geranial (15,45) e limoneno (4,91) analisados no ano de 1988 passaram para 28,79; 39,60; 10,05 analisadas em 2016, respectivamente, mostrando um aumento no teor de óleo essencial.

ETAPA IV: DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DA DROGA DE ORIGEM VEGETAL COM MONITORAMENTO DO TEOR DE UMIDADE E DO ÓLEO ESSENCIAL, UTILIZANDO O MARCADOR QUÍMICO ATIVO (CITRAL).

6.6 Determinação do perfil cromatográfico dos óleos essenciais e do extrato etanólico 20% por CCD

A análise por CCD demonstrou que os óleos essenciais obtidos por arraste a vapor, cooção e do extrato etanólico 20% possuem o mesmo perfil cromatográfico (Figura 18). Pode-se destacar, principalmente, três manchas azul-violáceas de fatores de retenção 0,47, 0,59, e 0,71. Ressalta-se que as condições de obtenção de extrato etanólico 20% por meio de maceração a frio conduziu a extração dos mesmos constituintes presentes no óleo essencial.

Figura 19 - Perfil cromatográfico dos óleos essenciais obtidos por arraste a vapor, coação e do extrato etanólico 20%.



Fonte: elaborado pelo autor. OEAR: óleo essencial obtido por arraste à vapor; OECo: óleo essencial obtido por coação; EA: extrato etanólico 20%.

6.7 Análise dos óleos essenciais por CG/EM: dessecação x extração

Verificou-se que através da extração do óleo essencial pela técnica de coação, o rendimento do óleo essencial das folhas dessecadas é maior do que das folhas frescas, sendo que a dessecação à sombra conduziu a um maior rendimento do óleo essencial, apresentando um valor de 0,68%, conforme demonstra a Tabela 5. A coleta das folhas para amostras obtidas foram realizadas no mesmo dia e na mesma hora (9 h).

Tabela 5 – Rendimento de óleo essencial e teor dos constituintes químicos majoritários do óleo essencial de *L. alba*, quimiotipo II, extraído por coação, comparando com folhas frescas, dessecadas à sombra e em estufa.

Condições	Folha fresca	Dessecação à sombra	Dessecação em estufa
Hora da colheita	9 h	9 h	9 h
Óleo essencial%	0,28	0,68	0,51
Neral%/TR (min)	28,51/19.200	31,11/ 19.194	27,42/ 19.227
Geranial%/TR (min)	33,78/20.263	43,72/ 20.265	34,26/ 20.308
Limoneno%/TR (min)	6,71/11.451	9,45/ 11.447	14,54/ 11.453

Fonte: elaborado pelo autor. TR (min): tempo de retenção em minutos.

Observou-se pela análise por CG/EM que o óleo essencial obtido por coação, a partir das folhas dessecadas à sombra, demonstrou maior teor do marcador ativo citral

(mistura de neral e geranial), do que as folhas dessecadas em estufa (Tabela 5).

Através da extração do óleo essencial pela técnica de arraste a vapor d'água, o rendimento do óleo essencial das folhas dessecadas é maior do que das folhas frescas, sendo que a dessecação à sombra conduziu à um maior rendimento do óleo essencial (1,2%), conforme a Tabela 6. A coleta das folhas para amostras obtidas foram realizadas no mesmo dia e na mesma hora (9 h).

Tabela 6 – Rendimento de óleo essencial e teor dos constituintes químicos majoritários do óleo essencial de *L. alba*, quimiotipo II, extraído por arraste à vapor, comparando com folhas frescas, dessecadas à sombra e em estufa.

Condições	Folha fresca	Dessecação à sombra	Dessecação em estufa
Hora da colheita	9 h	9 h	9 h
Óleo essencial%	0,12	1,2	0,60
Neral%/TR (min)	17,42/ 30.256	28,79/ 30.751	28,12/ 30.550
Geranial%/TR (min)	22,28/ 32.491	39,60/ 32.511	34,63/ 32.509
Limoneno%/TR (min)	18,95/ 17.490	10,05/ 17.835	9,58/ 17.798

Fonte: elaborado pelo autor. TR (min): tempo de retenção em minutos.

A análise dos óleos essenciais obtidos por arraste a vapor a partir das folhas dessecadas à sombra e em estufa, demonstrou teores semelhantes de seu marcador químico ativo citral (Tabela 6).

O efeito da secagem sobre os constituintes químicos voláteis de várias plantas medicinais e aromáticas tem sido objeto de estudo, os quais relacionam mudanças na concentração dos componentes com as características do método de secagem e os parâmetros ligados à droga vegetal. Observou-se que as técnicas de dessecação (sombra e estufa) e as técnicas de extração do óleo essencial (coação e arraste a vapor d'água) podem influenciar nos teores do constituinte químico citral (neral e geranial) e limoneno.

A temperatura de secagem da droga vegetal também influencia sobre o teor e a qualidade do óleo essencial. Nagão et al. (2005) verificaram que a temperatura de secagem de 70°C apresentou resultados tanto no tempo de secagem como no rendimento do óleo. De alguma forma essa temperatura (70°C) interferiu na permeabilidade e/ou na resistência físico/mecânica dos tecidos foliares, proporcionando a retenção dos compostos voláteis nas

estruturas de origem. Neste trabalho, as folhas dessecadas à sombra conduziu à um maior rendimento do óleo essencial (1,2%), conforme a Tabela 6.

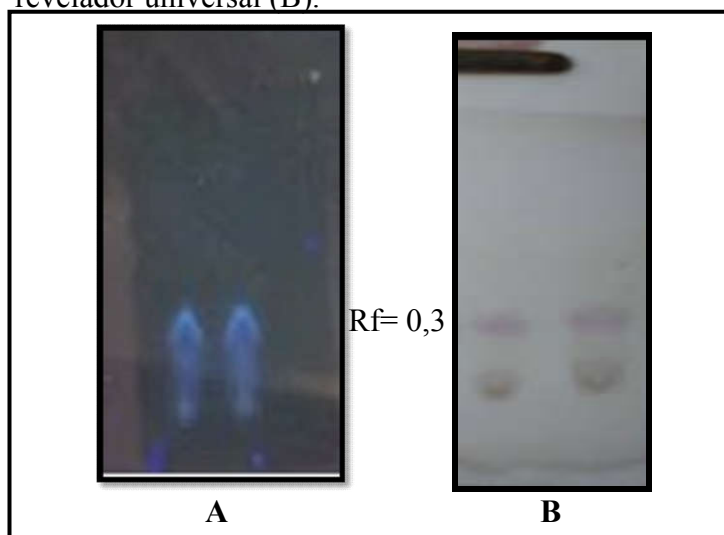
ETAPA V: DETERMINAÇÃO DE MARCADOR QUÍMICO ANALÍTICO DE *LIPPIA ALBA*, QUIMIOTIPO II.

6.8 Purificação e isolamento dos constituintes químicos do extrato etanólico

A purificação do extrato etanólico 20% por meio da coluna cromatográfica de amido forneceu 11 frações com polaridades distintas, demonstrando que o amido é um bom adsorvente para auxiliar na pré-purificação deste extrato.

Após analisadas, as frações reunidas e codificadas da seguinte maneira: F (1 e 2), F (3 a 6) e F (7 a 11). Esta fração, F (7 a 11), foi purificada em cromatografia de exclusão molecular por sephadex, a qual conduziu à obtenção de um sólido fluorescente e esbranquiçado codificado com ECII.

Figura 19 - Placas cromatográficas de sílica das frações isoladas em coluna de sephadex. Revelação em câmara de luz ultravioleta (A) e revelação em solvente revelador universal (B).



Fonte: elaborado pelo autor.

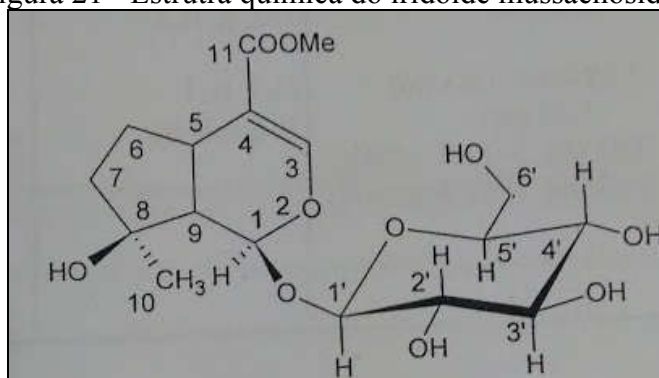
A análise de ECII por CCD demonstrou uma mancha principal com Rf 0,3, a qual se apresentou violácea após revelação com revelador universal (Figura 19).

A título de discussão, foi obtido o espectro de RMN ^1H e comparou-se o seu perfil espectral com os dados de Barbosa (2003, p.132) para o iridóide, assim descritos:

O espectro de RMN ^1H de LAII-3 revelou um sinal duplo centrado em δ 7,42 (d, $J=1,0$ Hz) referente à um prótio ligado a carbono sp^3 , possivelmente conjugado, e um duplete centrado em δ 5,48 (d, $J=4,24$ Hz) correspondente a um prótio provavelmente ligado a carbono cetálico. A presença de um duplete centrado em δ 4,69 (d, $J=7,90$ Hz) associado a prótio oxigenado possivelmente ligado a carbono anomérico, bem como a existência de sinais múltiplos na região de δ 3,92 a 3,20 reforçou a existência de uma unidade osídica ligada ao composto. A presença de um grupamento metoxila foi confirmada através de um singlete em δ 3,71 referente a três prótios. Sinais múltiplos associados a hidrogênios ligados a carbonos sp^3 do tipo metilênico e metínico foram observados em δ 2,28 (m); 2,24 (dd, $J=4,20$ Hz); 1,73 (m) e 1,45 (m). Observou-se ainda, um singlete em δ 1,34 referente a prótios metílicos, ligado a carbono sp^3 oxigenado.

Seguindo essa descrição, verificou-se em ECII várias faixas de absorção semelhantes ao iridóide: sinais múltiplos entre δ 1,42 a δ 2,36 referentes aos hidrogênios ligados ao carbono sp^3 do tipo metilênico e metínico; singlete em δ 1,33 indicativo de próton metílico; e picos de pequena intensidade entre δ 3,21 a δ 4,6, possivelmente referente à unidade osídica, destacando-se um singlete em δ 7,28. Além disso, observou-se uma faixa de absorção entre δ 0,71 a δ 1,12 compatíveis com impurezas de substâncias graxas. A Figura 21 mostra a estrutura química do iridóide mussaenosídeo isolada e determinada por Barbosa (2003) em *L. alba* quimiotipo II.

Figura 21 - Estrutura química do iridóide mussaenosídeo.



Fonte: Barbosa (2003).

A ECII pode pertencer à classe química iridóide, mas para uma determinação estrutural precisa e inequívoca, necessitaria obter ECII com maior grau de pureza e maior rendimento, além da obtenção de outros tipos de espectros, como por exemplo, RMN ^{13}C .

Diante desse contexto de discussão, a substância isolada ECII, com perfil cromatográfico por CCD definido, permite ser indicada como um marcador químico analítico segundo a RDC 26/2014.

7. CONCLUSÕES

As características morfoanatômicas das folhas de *L. alba* quimiotipo II não as diferenciam precisamente de outros quimiotipos, pois apresenta os mesmos parâmetros anatômicos, porém os caracteres organolépticos auxiliam na diferenciação entre os quimiotipos existentes, conforme já concluído por estudos anteriores. Ainda, foi possível concluir que o conhecimento das estruturas foliares é importante na compreensão da permeabilidade do óleo essencial frente à diferença na temperatura de secagem da droga vegetal.

Através da análise dos cromatogramas constantes no banco de germoplasma do horto FJAM, pode-se supor que houve um melhoramento genético da espécie *L. alba* no que diz respeito à composição do óleo essencial com aumento dos teores de citral (neral e geranial) e limoneno nas análises realizadas ao longo de quase trinta anos (1988 a 2016).

A técnica de extração de óleo essencial por arraste a vapor d'água conduz a um maior rendimento de óleo essencial do que a técnica de coação.

A dessecação das folhas frescas à sombra demonstra ser o método de obtenção de óleo essencial com maior rendimento, mais viável e de menor custo, sendo a técnica eleita para obtenção da droga vegetal para a preparação de extrato fluido de cidreira nas Farmácias Vivas.

A partir deste trabalho, é possível cumprir o que dispõe a RDC 26/2014 de acordo com a determinação dos dois tipos de marcadores químicos (ativo e analítico). O marcador químico ativo da espécie *L. alba* é o monoterpene citral, pois é o responsável pelas atividades terapêuticas da cidreira (calmante e ansiolítica); e o marcador analítico desta espécie é o ECII, pois pode diferenciar a espécie *L. alba* de outras que contenham o constituinte citral, como capim santo e melissa, uma vez que não há registros na literatura desse composto nestas espécies.

A obtenção da droga vegetal pela determinação das técnicas farmacêuticas deste estudo é importante para garantir que o extrato fluido de cidreira tenha a mesma quantidade de substâncias ativas, auxiliando na identificação e controle de qualidade da mesma, sendo

portanto, essencial para que se obtenha um produto fitoterápico que apresente reprodutibilidade e constância dos efeitos biológicos.

REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, D.; NAVARRO, M.; MONTERO, P. Composición Química del Aceite Esencial de las Hojas de Toronjil (*Melissa officinalis* L.). **Información Tecnológica**, v. 24, n. 4, 2013.
- ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A. Kovats índices as a presentation routine in mass espectro searches of volitates. **Journal of Nature Procedure**, n.47, p. 890-892, 1984.
- AMARAL, U.; SANTOS, M. G. Melhoramento genético e aspectos fitotécnicos de erva cidreira-brasileira [*Lippia alba* (Mill) N. E. Br. **Agrarian academy**., v. 1, n. 2, 2014.
- ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; LIMA, M. P.; Chemical composition of the essential oils of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf cultivated in North of Brazil. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**., v. 12, p. 41-45, 2009.
- ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R., ZORZETTO FILHO, D. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, n. 4, p. 233-42, 2001.
- ANDREGHETTI-FRÖHNER, C. R.; SINCERO, T. C. M.; SILVA, A. C.; SAVI, L. A.; GAIDO, C. M.; BETTEGA, J. M. R. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. **Fitoterapia**, v. 76, p. 374-8, 2005.
- ARA, N.; NUR. M. N.; ARMAN, M. S.; WAHID, M. I. I.; AHMED, M. In vitro antimicrobial and cytotoxic activities of leaves and flowers extracts from *Lippia alba*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**., v. 12, p. 87-90, 2009.
- BACKHOUSEA, N.; DELPORTEA, C.; APABLAZAA, C.; FARIÁS, M.; GOÏTYA, L.; ARRAUA, S.; NEGRETEA, R.; CASTROA, C.; MIRANDAB, H. Antinociceptive activity of *Buddleja globosa* (matico) in several models of pain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 160 -165, 2008.
- BANDEIRA, M. A. M. **Aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Alemão): constituintes químicos e ativos da planta em desenvolvimento e adulta**. 322 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.
- BANDEIRA, M. A. M.; GOMES, A. B.; BRASIL, A. R. L.; PEIXE, J. C. O.; MAGALHÃES, K. N.; SÁ, K. M.; CARVALHO, M. T. F. P.; MONTEIRO, P. M.; ROMERO, N. R.; FONSECA, S. G. C. **A fitoterapia no ciclo da assistência farmacêutica: inserção das farmácias vivas**, Fortaleza: HBM, 2015, 72 p..
- BARBOSA, R. A. Núcleo de Fiterápicos do Ceará: estado da arte e perspectivas. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 5, p. 1-2, 2007.
- BARBOSA, L. C. A.; PEREIRA, U. A.; MARTINAZZO, A. P.; MALTHA, C. R.; TEIXEIRA, R. R.; MELO, E. C. Evaluation of the chemical composition of Brazilian commercial *Cymbopogon citratus* (D.C.) stapf samples. **Molecules**, v. 13, n. 8, p. 1864-1874, 2008.

BARBOSA, F. G. **Contribuição ao Conhecimento Químico de Três Quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown Cultivados no Horto de Plantas Medicinais da UFC.** 2003. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza- CE, 2003.

BARROS, F. M. C.; ZAMBARDA, E. O.; HEINZMANN, B. M.; MALLMANN, C. A. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Química Nova**, v. 32, p. 861–867, 2009.

BLANCO, M. A.; COLAREDA, G. A.; VAN BAREN, C.; BANDONI, A. L.; RINGUELET, J.; CONSOLINI, A. E. Antispasmodic effects and composition of the essential oils from two South American chemotypes of *Lippia Alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 803–809, 2013.

BLANK, A. F.; OLIVEIRA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; FAQUIN, V. Efeitos da adubação química e da calagem na nutrição de melissa e hortelã-pimenta. **Horticultura Brasileira**, v. 24, p. 195-198, 2006.

BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J. **Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs.** Newton, MA: Integrative Medicine Communications, 2000.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira.** 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 16 de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da União, República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, DF, 8 de maio de 2014, Disponível em: <http://www.brasilsus.com.br>. Acesso em: 25 abr. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada RDC n. 14 de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União, República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, DF, 5 abr. 2010. Disponível em: <http://www.brasilsus.com.br>. Acesso em: 23 set. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 18 de 03 de abril de 2013. Dispõe sobre as boas práticas de processamento e armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e officinais de plantas medicinais e fitoterápicos em farmácias vivas no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). **Diário Oficial da União, República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, DF, 5 abr. 2013. Disponível em: <http://www.bvsms.saude.gov.br>. Acesso em: 25 abr. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** Brasília: Série B - Textos Básicos de Saúde. 60 p., 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 2007.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMAN, B. C. **Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica.** 11. ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2012, 2112 p.

CARLINI, E. A.; CONTAR, J. D. P.; SILVA-FILHO, A. R.; SILVEIRA-FILHO, N. G.; FROCHTENGARTEN, M. L.; BUENO, O. F. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 17, n. 1, p. 37–64, 1986.

CARMONA, F. A. B.; ANGELUCCI'S, M. A; SALES, T. M.; CHIARATTI, F. B.; HONORATO, A. B.; RANDALL, V.; BIANCHI, A. P. *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown hydroethanolic extract of the leaves is effective in the treatment of migraine in women. **Phytomedicine**, v. 20, p. 947– 950, 2013.

CARVALHO, L. F.; DIMENSTEIN, M. O modelo de atenção à saúde e o uso de ansiolítico entre mulheres. **Estudos de Psicologia**, v. 9, n. 1, p. 121-129, 2004.

CARVALHO, A. L.; COSTA, M. R.; FAGUNDES, H. uso racional de psicofarmacos. **CPSM/SMS-Rio**, v.1, n. 1, abril-junho, 2006.

CARVALHO, R. S.M. **Investigação da atividade farmacológica central dos extratos aquoso e hidroalcoólico, da fração butanólica e do verbascosídeo de *Lippia alba* (MILLER) N. E. Brown (falsa melissa) – Verbenaceae.** 2006. 96 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

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: UFV, 2004. 113 p.

CASTRO, D. M.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M. Composição fitoquímica dos óleos essenciais de folhas da *Lippia alba* (Mill) N. E. Br em diferentes épocas de colheita e partes do ramo. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais.**, v. 4, p. 75-79, 2002.

CONDE, R.; CORRÊA, V. S. C.; CARMONA, F.; CONTINI, S. H. T.; PEREIRA, A. M. S. Chemical composition and therapeutic effects of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown leaves hydro-alcoholic extract in patients with migraine. **Phytomedicine**, v. 18, p. 1197 – 1201, 2011.

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

CORAZZA, S. **Aromacologia: uma ciência de muitos cheiros.** 3. ed. São Paulo: SENAC, 2002. 414 p.

COSTA, M. C. C. D.; AGUIAR, J. S.; NASCIMENTO, S. C. Atividade citotóxica de extratos brutos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense.**, v. 23, n. 3, p.349 - 352, 2004.

CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais e química fina. **Química nova**, v. 16,

n. 3, p. 224-228, 1993.

CUNHA, M. A.; BARROS, F. M. C.; GARCIA, L. O.; LIMA-VEECK, A. P. L.; HEINZMAN, B. M.; EMANUELLI, T.; BALDISSEROTTO, B. Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 306, p. 403 – 406, 2010.

DEVI, R. C.; SIM, S. M.; ISMAIL, R. Spasmolytic effect of citral and extracts of *Cymbopogon citratus* on isolated rabbit ileum. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 47, p. 143-156, 2011.

DONSI, F.; ANNUNZIATA, M.; SESSA, M.; FERRARI, G. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 1908-1914, 2011.

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

DUARTE, M. R.; ZANETI, C. C. Estudo farmacobotânico de folhas de capim-limão: *Cymbopogon citratus* (DC.) STAPF, Poaceae. **Visão Acadêmica**, v. 5, p. 117-124, 2004.

EHLERT, P. A. D. **Épocas de plantio, idades e horários de colheita na produção e qualidade do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br., quimiotipo limoneno-carvona**. 2003. 106 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2003.

ENCALADA, M. A.; HOYOS, K. M.; REHECHO, S.; BERASATEGI, I.; CIRIANO, M. G.; ANSORENA, D.; ASTIASARAN, I.; NAVARRO-BLASCO, I.; CAVERO, R.Y.; CALVO, M. I. Anti-proliferative effect of *Melissa officinalis* on human colon câncer cell line. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 66, p. 328–334, 2011.

ESQUIVEL, A.; VARGAS, P. Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales. **Tecnología en Marcha**, v. 20, n. 4, p. 41-50, 2007.

FECKA, I.; TUREK, S. Determination of water-soluble polyphenolic compounds in commercial herbal teas from Lamiaceae: pepper mint, melissa, and sage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 10908–10917, 2007.

FÉLIX-SILVA, J.; TOMAZ, I.M.; SILVA, M.G.; SANTOS, K.S.C.R.; SILVA-JÚNIOR, A.A.; CARVALHO, M.C.R.D.; SOARES, L.A.L.; FERNANDES-PEDROSA, M.F. Identificação botânica e química de espécies vegetais de uso popular no Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 548 - 555, 2012.

FIRMINO, K. F.; ABREU, M. H. N. G.; PERINI, E.; MAGALHÃES, S. M. S. Fatores associados ao uso de benzodiazepínicos no serviço municipal de saúde da cidade de Coronel Fabriciano, Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 27, n. 6, p. 1223- 1232, 2011.

FIRMINO, K. F.; ABREU, M. H. N. G.; PERINI, E.; MAGALHÃES, S. M. S. Utilização de benzodiazepínicos no Serviço Municipal de Saúde de Coronel Fabriciano, Minas Gerais. **Ciências & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 1, p. 157-166, 2012.

FORSAN, M. A. **O uso indiscriminado de benzodiazepínicos: uma análise crítica das práticas de prescrição, dispensação e uso prolongado**. 2010. 26 f. Monografia (Especialização em Atenção Básica em Saúde da Família) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2010.

GAO, S.; SINGH, J. In vitro percutaneous absorption enhancement of lipophilic drug tamoxifen by terpenes. **Journal of Controlled Release**, v. 51, p. 193–199, 1998.

GOMES, J. V. D.; FAITANIN, R. D.; BRASILEIRO, B. G.; SILVEIRA, D.; JAMAL, C. M. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades trombolítica e citotóxica de *Cecropia hololeuca* miq. (urticaceae), *Lippia alba* (mill.) N.E.BR. ex p. Wilson (Verbenaceae) e *Zanthoxylum rhoifolium* lam (rutaceae). **Infarma**, v. 28, n. 1, 2016.

GOMES, V. B. **Acompanhamento do uso do Elixir de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (erva-cidreira) como ansiolítico na atenção Psicossocial**. 2014. Tese (Doutorado em Saúde Coletiva) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE, 2014.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; DERMONT, C.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. The essential oil of *Lippia alba*: analysis of samples from french overseas departments and review of previous works. **Chemistry & Biodiversity**, v. 3, p. 1116-1125, 2006.

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

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOLLINGWORTH, S. A.; SISKIND, D.J. Anxiolytic, hypnotic and sedative medication use in Australia. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, v. 19, n. 3, p. 280-288, 2010.

JANNUZZI, H.; MATTOS, J. K. A.; SILVA, D. B.; GRACINDO, L. A. M.; VIEIRA, R. F. Avaliação agrônômica e química de dezessete 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, 2011.

JANNUZZI, H. V.; MATTOS, J. K. A.; VIEIRA, R. F.; SILVA, D. B.; BIZZO, H. R.; GRACINDO, L. A. M. Avaliação agrônômica e identificação de quimiotipos de erva cidreira no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p. 412-417, 2010.

JULIÃO, L. S.; TAVARES, E. S.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. (erva-cidreira). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 36-38, 2003.

KENNEDY, D. O.; WAKE, G.; SAVELEV, S.; TILDESLEY, N. T. J.; PERRY, E. K.; WESNES, K. A.; SCHOLEY, A. B. Modulation of mood and cognitive performance following acute administration of single doses of *Melissa officinalis* (Lemon Balm) with human CNS nicotinic and muscarinic receptor-binding properties. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 1871–1881, 2003.

KENNEDY, D.O.; LITTLE, W.; HASKELL, C. F.; SCHOLEY, A. B. Anxiolytic effects of a combination of *Melissa officinalis* and *Valeriana officinalis* during laboratory induced stress. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 96–102, 2006.

KHADRI, A.; NEFFATI, M.; SMITI, S.; FALE, P.; LINO, A. R. L.; SERRALHEIRO, M. L. M.; ARAUJO, M. E. M. Antioxidant, antiacetylcholinesterase and antimicrobial activities of *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng (lemon grass) from Tunisia. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 331–336, 2010.

LADER, M. H. Limitations on the use of benzodiazepines in anxiety and insomnia: are they justified. **European Neuropsychopharmacology**, v. 9, n. 6, p. 399-405, 1999.

LAGNAOUI, R.; DEPONT, F.; FOURRIER, A.; ABOUELFATH, A.; BÉGAUD, B.; VERDOUX, H. Patterns and correlates of benzodiazepine use in the French general population. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 60, n. 7, p. 523-9, 2004.

LAUNERT, Edmund. **The HamLyn guide to edible medicinal plants of Britain and Northern Europe**. 4. ed. London: HamLyn, 1989, 288 p.

LEE, J.; CHAE, K.; HA, J.; PARK, B. Y.; LEE, H. S.; JEONG, S.; KIM, M. Y.; YOON, M. Regulation of obesity and lipid disorders by herbal extracts from *Morus alba*, *Melissa officinalis*, and *Artemisia capillaris* in high-fat diet-induced obese mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 263–270, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008, 489 p.

LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; HABBER, L. L.; MARQUEZ, M. O. M. Produção de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. em diferentes épocas, sistemas de cultivo e adubações. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 3, p. 552-560, 2014.

MATOS, J. F. A. As ervas cidreiras do Nordeste do Brasil estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, n. 77, p. 137-41, 1996.

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

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. 3. ed. Fortaleza: UFC, 1998. 219 p.

MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 2. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2000. 346 p.

MATOS, F. J. A. **Farmácias Vivas**. 4. ed. Fortaleza: UFC, 2002, 267 p.

MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. Fortaleza: UFC, 2007, 365 p.

MATOS, F. J. A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. 3. ed. Fortaleza: UFC, 2009, 150 p.

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, série BNB - ciência e tecnologia 2, 2007, 61-63 p.

MATTOS, S. H. **Estudos fitotécnicos da *Mentha arvensis* L. var. *piperacens* Holmes como produtora de mentol no Ceará**. 2000. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.

MARTÍNEZ, J. V.; BERNAL, H. Y.; CÁCERES, A. **Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas**. 1. ed. Bogotá: Convenio Andrés Bello, 2000.

MESA-ARANGO, A. C.; MONTIEL-RAMOS, J.; ZAPATA, B.; DURÁN, C.; BETANCURGALVIS, L.; STASHENKO, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 878-884, 2009.

MIMICA-DUKIC, N.; BOZIN, B.; SOKOVIC, M.; SIMIN, N. Antimicrobial and anti-oxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2485–2489, 2004.

NAGÃO, E. O.; INNECO, R.; MATTOS, S. H.; MARCO, C. A. Influence of the drying period in the dry and rainy seasons on the essential oil of *Lippia alba* (Mill) N. E. Br., in the conditions of the State of Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, v. 36, n. 1, p. 53-59, 2005.

NASCIMENTO, I. B. do; INNECCO, R.; MARCO, C. A.; MATTOS, S. H.; NAGAO, E. O. Efeito do horário de corte no óleo essencial de capim-santo. **Revista Ciência Agronômica**, v. 34, n. 2, p. 169-172, 2003.

NASTASY, H.; RIBEIRO, M.; MARQUES, A. C. P. R. **Abuso e dependência dos benzodiazepínicos**. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Psiquiatria. 2008.

NEGRELLE, R. R. B.; GOMES, E. C. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: chemical composition and biological activities. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 9, n. 1, p. 80-92, 2007.

NUNES, R. S.; XAVIER, H. S.; ROLIM NETO, P. J.; SANTANA, D. P.; ALBUQUERQUE,

U. P. Botanical standardization of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae). **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 19, n. 2, p. 115-118, 2000.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 474 p.

OLIVEIRA, F., AKISSUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1993, 216 p.

ORTIZ, M. I.; RAMÍREZ-MONTIEL, M. L.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M. P.; PONCE-MONTER, H. A.; CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, G.; CARIÑO-CORTÉS, R. The combination of naproxen and citral reduces nociception and gastric damage in rats. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, n. 10, p. 1691-1697, 2010.

PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZÉN, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, p. 315-327, 2007.

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

PÉRTILE, R. **Isolamento e elucidação estrutural de compostos polares de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown Ex Britt. & Wils.** 2007. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2007.

PETENATTI, M. E.; GETTE, M. A.; CAMÍ, G. E.; POPOVICH, M. C.; MARCHEVSKY, E. J.; DEL VITTO, L. A.; PETENATTI, E. M. Quantitative micrograph, HPLC and FTIR profiles of *Melissa officinalis* and *Nepeta cataria* (Lamiaceae) from Argentina. **Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias - UNCuyo**, v. 46, n. 2, p. 15-27, 2014.

PONCE-MONTER, H.; FERNANDEZ-MARTINEZ, E.; ORTIZ, M.I.; RAMIREZ-MONTIEL, M.L.; CRUZ-ELIZALDE, D.; PEREZ-HERNANDEZ, N. Spasmolytic and anti-inflammatory effects of *Aloysia triphylla* and citral, in vitro and in vivo studies. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 46, p. 309-319, 2010.

PUATANACHOKCHAI, R.; KISHIDA, H.; DENDA, A.; MURATA, N.; KONISHI, Y.; VINITKETKUMNUEN, U. Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus*, Stapf) extract on the early phase of hepatocarcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine in male Fischer 344 rats. **Cancer Letters**, v. 183, n. 1, p. 9-15, 2002.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. Teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. in vitro sob influência do meio de cultura. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, n. 2, p. 331-335, 2009.

ROCHA, R. P. **Avaliação do teor e da composição do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e *Thymus vulgaris* submetidos a processos de secagem e armazenamento.** 2011. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2011.

RODRIGUES, A. G.; DE SIMONI, C. Plantas medicinais no contexto de políticas públicas. **Informe Agropecuário**, v. 31, n. 255, p. 7-12, 2010.

SADRAEY, H.; GHANNADI, A.; MALEKSHAHI, K. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on a rat ileum contractions. **Fitoterapia**, v. 74, p. 445-452, 2003.

SANTOS, M. R. A.; FERNANDES, C. F.; INNECO, R. Efeito da adubação orgânica na produção de biomassa e óleo essencial da *Lippia alba*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 32, p. 10, 2006.

SANTOS, M. R. A.; INNECO, R.; SOARES, A. A. Caracterização anatômica das estruturas secretoras e produção de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. em função do horário de colheita nas estações seca e chuvosa. **Revista Ciência Agronômica**, v. 35, n. 382, p.377-383, 2004.

SANTOS-MENDES, M. M. F. B. S. **Caracterização morfo-anatômica, fitoquímica e molecular de 8 formas de *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. ex. Britt e Wilson, cultivadas em Botucatu**. 2001. 102 f. Tese (Doutorado em Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

SANTOS, M. R. A. **Estudos agronômicos e botânicos de erva cidreira (quimiotipo limoneno-carvona)**. 2003. 89 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

SHAH, G.; SHRI, R.; PANCHAL, V.; SHARMA, N.; SINGH, B.; MANN, A. S. Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 2, n. 1, p. 3-8. 2011.

SHIH, H. L.; MEI, L.; WEI, C.; YI, S.; KUAN, H.; CHERNG, W.; LEE, Y. A medicinal herb, *Melissa officinalis* L. ameliorates depressive-like behavior of rats in the forced swimming test via regulating the serotonergic neuro transmitter. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 266–272, 2015.

SHUKLA, R.; KUMAR, A.; SINGH, P.; DUBEY, N. K. Efficacy of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its monoterpene aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B1 production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 165- 170, 2009.

SILVA, T. R. S.; SALIMENA, F. R. G. Novas combinações e novos sinônimos em *Lippia* e *Lantana* (Verbenaceae). **Revista Darwiniana**, v. 40, n. 1, p. 57-59, 2002.

SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L. **Constituintes micromoleculares de plantas do nordeste com potencial farmacológico: com dados de RMN 13C**. Fortaleza: Expressão Gráfica e Editora, 2005, 7 p.

SIMÓN, M.; KERRY, B. **Principles and Practice of Phytotherapy: Modern Herbal Medicine**. Toronto: Churchill Livingstone, 2000, 643 p.

SINGH, P.; SHUKLA, R.; KUMAR, A.; PRAKASH, B.; SINGH, S.; DUBEY, N. K. effect of *Citrus reticulata* and *Cymbopogon citratus* essential oils on *Aspergillus flavus* growth and

aflatoxin production on asparagus racemosus. **Mycopathologia**, v. 170, p. 195–202, 2010.

SORENSEN, J. *Melissa officinalis*. Essential oil authentic production pharmacological activity. A review. **Journal of Aromatherapy**, v. 20, n. 4, p. 25-30, 2000.

SOUSA, A. R. L.; OPALEYE, E. S.; NOTO, A. R. Contextos e padrões do uso indevido de benzodiazepínicos entre mulheres. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 4, p. 1131-40, 2013.

SOUSA, D. G.; SOUSA, S. D. G.; SILVA, R. E. R.; SILVA-ALVES, K. S.; FERREIRA-DASILVA, F. W.; KERNTOPF, M. R.; MENEZES, I. R. A. ; LEAL-CARDOSO, J. H.; BARBOSA, R. *Lippia alba* and citral block excitability of sciatic nerve. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 8, 2015.

SWEETMAN, S.C. **Martindale**: the complete drug reference. 34. ed. London: Pharmaceutical Press, 2005, 2756 p.

TAIWO, A. E. **Alterações comportamentais decorrentes da administração de Melissa officinalis, em ratos**. 2007. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

TAVARES, E. S.; JULIÃO, L. S.; LOPES, D.; BIZZO, H. R.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, p. 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, p. 204-220, 2011.

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

VELLUTI, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; MARÍN, S. Effect of essential oils of cinnamon, clove, lemon grass, oregano and palmarosa on growth of and fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* in maize. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 1141–1146, 2004.

VENTRELLA, M. C. **Produção de folhas, óleo essencial e anatomia foliar quantitativa de Lippia alba (Mill) N. E. Br. (Verbenaceae) em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita**. 2000. 84 f. Tese (Doutorado em Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

VERTUANI, S.; BEGHELLI, E.; SCALAMBRA, E.; MALISARDI, G.; COPETTI, S.; DAL TOSO, R.; BALDISSEROTTO, A.; MANFREDINI, S. Activity and Stability Studies of Verbascoside, a Novel Antioxidant, in Dermo-Cosmetic and Pharmaceutical Topical Formulations. **Molecules**. v.16, p. 7068, 2011.

VIDAL, WALDOMIRO NUNES; VIDAL, MARIA ROSÁRIO RODRIGUES. **Botânica –**

Organografia: quadros sinóticos ilustrados de fanerógamos. 4. ed. Viçosa: UFV, 2006. 124 p.

WRIGHT, S. C.; MAREE, J. E.; SIBANYONI, M. Treatment of oral thrush in HIV/AIDS patients with lemon juice and lemon grass (*Cymbopogon citratus*) and gentian violet. **Phytomedicine**, v. 16, p. 118–124, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The World Medicines Situation 2011.** Traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva: WHO, 2011. 14 p

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Monographs on Selected medicinal plants.** v. 2. Ginebra: World Health Organization, 2002, 7 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Investing in treatment for depression and anxiety leads to fourfold return.** Media centre. WASHINGTON DC, USA: WHO, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/depression-anxiety-treatment/en/#>>. Acesso em: 27 outubro 2016.