

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA, ANTITUMORAL E
ANTIINFLAMATÓRIA DE EXTRATOS BRUTOS DE *Lippia alba*
(MILL.) N. E. BROWN

Jaciana dos Santos Aguiar

RECIFE – 2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA, ANTITUMORAL E
ANTIINFLAMATÓRIA DE EXTRATOS BRUTOS DE *Lippia alba*
(MILL.) N. E. BROWN**

**Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos requisitos para
obtenção do grau de mestre em Ciências Biológicas
na área de concentração Farmacologia, Fisiologia e
Química Medicinal.**

ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. Silene Carneiro do Nascimento

CO-ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. Maria do Carmo de Caldas Dias Costa

RECIFE - 2006

Aguiar, Jaciana dos Santos

Atividades antimicrobiana, citotóxica, antitumoral e antiinflamatória de extratos brutos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown / Jaciana dos Santos Aguiar. – Recife: A Autora, 2006.

70 f.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

1. *Lippia alba* 2 Erva cidreira 3. Atividade antimicrobiana 4. Atividade citotóxica 5. Atividade antitumoral I. Título.

**582.949.27
615.321
066**

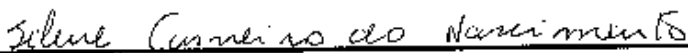
**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCB – 2006**

Atividades antimicrobiana, citotóxica, antitumoral e antiinflamatória de extratos brutos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown

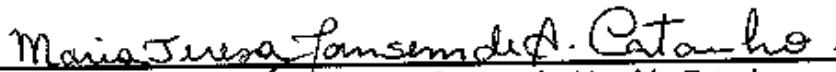
Jaciana dos Santos Aguiar

BANCA EXAMINADORA



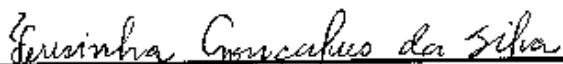
Profª Dra. Silene Carneiro do Nascimento

Orientadora - Departamento de Antibióticos – CCB – UFPE



Profª Dra. Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho

Departamento de Biofísica e Radiobiologia - CCB - UFPE



Profª Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

Departamento de Antibióticos – CCB - UFPE

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e irmãos pela paciência, compreensão, atenção, amor e amizades em todos os momentos de minha vida.

OFEREÇO

À minha co-orientadora e amiga, Prof^a
Dra. Maria do Carmo de Caldas Dias
Costa, pela atenção, carinho, incentivo as
pesquisas e por ser um pouco minha mãe.

SUMÁRIO

	página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
3 OBJETIVOS	14
3.1 Geral	14
Específicos	14
4 REFERÊNCIAS	15
5 CAPÍTULO I	21
Pharmacologic screening of crude extracts of <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae)	22
Abstract	23
Introduction	24
Experimental	25
Results	30
Discussion	31
Reference	32
6 CAPÍTULO II	41
Atividade antimicrobiana de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae)	42
Resumo	42
Abstract.....	43
Introdução	43

Material e métodos	45
Resultados e discussão	47
Referências	49
7 CONCLUSÕES GERAIS	55
8 ANEXOS	56
8.1 ANEXO A - Rendimento do material botânico de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown	56
8.2 ANEXO B - Constituintes químicos presentes em extratos brutos das folhas de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown	56
8.3 ANEXO C - Constituintes químicos presentes em óleos essenciais da raiz, caule e folhas de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown	57
8.4 ANEXO D - Determinação da DL₅₀	61
8.5 ANEXO E - Resumos publicados em Congressos	63
8.6 ANEXO F - Artigo publicado	64

AGRADECIMENTOS

À Deus e a minha família pela força e incentivo em todos os momentos de minha vida.

À Universidade Federal de Pernambuco, ao Departamento de Antibióticos e de Farmácia pelo uso de suas instalações e equipamentos.

Ao Laboratório de Fitoterapia da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA) pelo fornecimento do material botânico e pelo apoio e amizade dos funcionários.

À Prof^a Dra. Silene Carneiro do Nascimento, na orientação desse trabalho de forma paciente, pela forma que me acolheu e pelos ensinamentos.

À Prof^a Dra. Maria do Carmo de Caldas Dias Costa pela valiosa orientação, amizade, paciência e incentivo nos momentos difíceis.

À Prof^a Dra. Teresinha Gonçalves da Silva pela orientação nos trabalhos de atividade antiinflamatória e pela amizade sincera.

À Prof^a Késia Xisto da Fonseca Ribeiro de Sena pela orientação nos trabalhos de atividade antimicrobiana e pela amizade.

Aos Professores do Programa de Pós Graduação de Ciências Biológicas e Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, pelo empenho que conduziram as suas disciplinas.

À Prof^a Dra. Ivone Antônia de Souza pelos ensinamentos e pela amizade.

À Adenilda Eugênia de Lima e Liane Santos pelo profissionalismo e pela amizade.

À Maria Susete Mendonça e Maria D. Rodrigues pelo apoio, carinho, amizade, profissionalismo, momentos de alegria e descontração.

As Profas Dras Noemia Pereira dos Santos e Maria do Carmo Fraga pelos ensinamentos.

A Prof^a Dra Maria Teresa Jansem Cantanho pelas valiosas sugestões dadas nesse trabalho e ensinamentos.

A Nadja Celestino e Ana Catarina Passos pelas ajudas e amizade.

À Ana Carolina, Pedro e Tiago pela ajuda nos experimentos.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Antibióticos pela ajuda e atenção dedicadas.

À Etienne Lima pela valiosa correção das referências bibliográficas.

Aos amigos e colegas de turma do mestrado pelo companheirismo e momentos alegres.

LISTA DE FIGURAS

Figuras 1, 2. A espécie <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown na horta medicinal do Laboratório de Fitoterapia da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA).....	3
--	---

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento do material botânico de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown	56
Tabela 2. Constituintes químicos presentes em extratos brutos das folhas de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown.....	56
Tabela 3. Constituintes químicos presentes em óleos essenciais da raiz, caule e folhas de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown.....	57
Tabela 4. Determinação da DL ₅₀ do extrato etanólico da folha de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown.....	62
Tabela 5. Determinação da DL ₅₀ do extrato clorofórmico da raiz de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown	62

RESUMO

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae), amplamente distribuída em todo o território brasileiro, é conhecida popularmente como erva cidreira e utilizada na medicina popular como analgésica, febrífuga, antiinflamatória, antigripal e nas afecções hepáticas. Plantas cultivadas na horta medicinal do Laboratório de Fitoterapia da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA) foram utilizadas na produção de extratos brutos, para os quais atividades antimicrobiana, citotóxica, antitumoral e antiinflamatória foram avaliadas. Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, álcool-ácido resistente, fungo filamentosos e levedura. A atividade citotóxica de extratos clorofórmico da raiz e etanólico das folhas, foi avaliada frente à linhagem celular HeLa (derivada de adenocarcinoma de cérvix humano). A DL₅₀ foi determinada para extratos clorofórmicos da raiz e etanólicos das folhas e estes extratos testados para avaliação de ação antitumoral, frente ao Sarcoma 180, e ação antiinflamatória, pelo método do bolsão de ar, em camundongos albinos suíços (*Mus musculus*). Os resultados foram expressos como médias $\pm$ desvios padrão e médias $\pm$ erro padrão médio e para a análise estatística dos dados foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA), com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Extratos clorofórmico, acetônico e etanólico da raiz foram ativos frente a *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Monilia sitophila* e extratos hexânicos, etanólicos e metanólicos das folhas inibiram apenas *M. luteus*. Extratos etanólicos das folhas e clorofórmicos da raiz, não exibiram citotoxicidade frente à linhagem celular HeLa ($p < 0,01$). No experimento de toxidez aguda, em camundongos, o extrato etanólico da raiz apresentou DL₅₀ igual a 460mg/kg e o extrato clorofórmico da raiz apresentou DL₅₀ igual a 1146mg/kg. Os extratos etanólico das folhas e clorofórmico da raiz não apresentaram atividade antitumoral frente ao Sarcoma 180 ($p < 0,05$). Quando testados para atividade antiinflamatória apresentaram atividades significativas ($p < 0,05$) com inibição do processo inflamatório equivalente a 35,1% para o extrato etanólico da folha e 58,7% para o extrato clorofórmico da raiz. Compostos com ação antimicrobiana e antiinflamatória, estão presentes principalmente em extratos brutos das raízes e folhas de *L. alba*. Embora estes extratos não tenham exibido citotoxicidade frente as células HeLa, estudos de citotoxicidade anteriores realizados para estes extratos frente as linhagens celulares HEP-2 e NCI-H292, indicam que o uso medicinal da espécie deve ser feito com precaução.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana; atividade citotóxica; atividade antitumoral; atividade antiinflamatória; *Lippia alba*.

ABSTRACT

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae), widely distributed in all the Brazilian territory, is popularly known as cidreira and it is used as analgesic, febrifuge, antiinflammatory, antigripal and in hepatic affection in folk medicine. The Plant cultivated in medicinal garden of Phytotherapy Laboratory of Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA) has been used in the production of crude extract, for its antimicrobial, cytotoxic, antiinflammatory and antitumoral activities. Antimicrobial activity tests have been made front Gram-positive, Gram-negative and alcohol-acid resistant bacteria, filamentous fungi and yeast. The cytotoxic activity of chloroform extracts of root and ethanol extract of leaves were evaluated front HeLa cell line (adenocarcinoma cervix human being). The LD₅₀ was determined from chloroform extract of root and ethanol extract of leaves and those extracts were tested for antitumoral activity against Sarcoma 180, and for antiinflammatory effect by the air pouch method in Swiss albino mice (*Mus musculus*). The results are expressed as mean $\pm$ SD and mean $\pm$ SEM and for statistical analysis the data were assessed by ANOVA. Chloroform, acetone and ethanol extracts of root exhibited action front *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Stapylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Monilia sitophila* and hexane, ethanol and methanol extracts of leaves exhibited action front *M. luteus*. Ethanol extract of leaves and chloroform extract of root did not show citotoxicity front HeLa cell line ($p < 0.01$). The acute toxicity concentrations that killed 50% (LD₅₀) of albino Swiss mice were 460mg/kg for ethanol extract of root and 1146mg/kg for chloroform extract of root. The ethanol extract of leaves and chloroform extract of root did not show antitumoral activity against Sarcoma 180 ($p < 0.05$). In the antiinflammatory activity they showed significant effect ($p < 0.05$) with inhibition of 35.1% of ethanol extract of leaves and 58.7% of chloroform extract of root. Composites with antimicrobial and antiinflammatory action are mainly in crude extracts of roots and leaves of *L. alba*. Although the extracts did not show citotoxicity front HeLa cells, previous studies of citotoxicity were carried out front HEP-2 cell line and NCI-H292 and they indicate that the medicinal use of the species must be made with precaution.

Keywords: Antimicrobial activity; citotoxic activity; antitumoral activity; antiinflammatory activity; *Lippia alba*.

1 INTRODUÇÃO

Pesquisas sistemáticas para a obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica, podem ser executadas por meio de vários processos entre os quais os mais utilizados são: a síntese de novas moléculas; a modificação molecular de substâncias naturais e/ou sintéticas com propriedades farmacológicas definidas; e a extração, isolamento e purificação de novos compostos de fontes naturais especialmente de origem vegetal, que se caracteriza como uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas como medicamento. As plantas medicinais devem ser consideradas não apenas como matéria-prima, ponto de partida para a descoberta de novas moléculas, mas também como um recurso natural potencialmente ativo na forma de fitoterápicos padronizados e eficazes (DI STASI, 1996).

As plantas medicinais constituem-se em uma fonte interessante e ainda pouco explorada de recursos naturais para o desenvolvimento de novos quimioterápicos, podem ajudar a superar problemas concernentes à resistência e toxicidade dos antibióticos comerciais. Além disso, sua utilização tem um papel vital para sanar as necessidades básicas de saúde nos países em desenvolvimento. Isto gera grande interesse na realização de *screening* dessas plantas, para avaliar seu potencial medicinal comparando-se os resultados com os propagados pela medicina popular (AWADH ALI et al., 2001).

O emprego das plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos, desde as formas mais simples de tratamento local, provavelmente utilizada pelo homem das cavernas, até as formas tecnologicamente sofisticadas da fabricação industrial, utilizada pelo homem moderno (LORENZI e MATOS, 2002).

Pesquisas para encontrar compostos com propriedades antitumoral e antimicrobiana, produzidos por microrganismos e por plantas, vêm sendo conduzidas há mais de 40 anos e novos compostos tem sido encontrados. O interesse nesses compostos aumentou devido ao desenvolvimento de resistência pelos microrganismos, a muitos dos produtos comumente utilizados contra patógenos na agricultura e na medicina. Na quimioterapia do câncer, as drogas freqüentemente exibem severos efeitos colaterais, além de células tumorais adquirirem resistência também sendo um problema (COSTA, 2002).

Em 1960, o National Cancer Institute, iniciou um programa de *screening* biológico para extratos de uma grande variedade de recursos naturais. Um desses extratos mostrou exibir marcada atividade antitumoral contra uma vasta linha de tumores em roedores. Em 1967 os Drs. Monre E. Wall e Mansukh C. Wani isolaram o componente ativo, taxol, de uma árvore do Pacífico (*Taxus brevifolia*). Em 1970, o taxol teve sua estrutura química determinada e em 1980 cientistas do Albert Einstein Medical College, registraram sua atuação

sobre a tubulina dos microtúbulos, inibindo a divisão celular. Tratava-se de um mecanismo único, que fez o taxol uma nova classe de agente quimioterápico. Em 1989 foram registrados resultados clínicos de seu uso em câncer de ovário em estágio avançado. Em 1991 o taxol foi considerado pelo National Cancer Institute, a mais importante droga contra câncer dos últimos 15 anos e em 1992 a Food and Drug Administration (FDA) aprovou o taxol contra o câncer de ovário reincidente. Hoje a droga é usada para vários cânceres, incluindo mama, pulmão, Sarcoma de Kaposi (COSTA, 2002).

O objetivo primordial na indicação do uso de fitoterápicos na medicina humana não é substituir medicamentos registrados e já comercializados, mas sim aumentar a opção terapêutica dos profissionais de saúde ofertando medicamentos equivalentes, registrados, mais baratos, com espectros de ação mais adequados e talvez com indicações terapêuticas complementares às medicações existentes. Objetivos secundários, mas não menos importantes, é a valorização das tradições populares e o fornecimento de substrato autóctone para o desenvolvimento da indústria farmacêutica local (LAPA et al., 2004).

A espécie *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown pertencente à família Verbenaceae, exibe cerca de 175 gêneros e 2800 espécies, difundidas nos trópicos e subtropicais nas regiões temperadas do Hemisfério Sul e poucas espécies no Hemisfério Norte (BARROSO, 1991). Trata-se de um arbusto aromático, cujo aroma está relacionado aos constituintes predominantes nos óleos essenciais, os quais podem variar qualitativamente e quantitativamente, em função de diversos fatores, tais como: estações do ano, época de floração, idade da planta, quantidade de água circulante, resultante da precipitação, fatores geográficos e climáticos (CORRÊA, 1992; MATOS, 1998). Vulgarmente é conhecida como erva cidreira, chá de tabuleiro, cidrila, erva cidreira de arbusto, alecrim selvagem, cidreira brava, falsa melissa, erva cidreira brasileira, erva cidreira do campo, cidreira carmelitana, salva do Brasil, salva, salva limão, alecrim do campo e salva brava (MELO e XAVIER FILHO, 2000; LORENZI e MATOS, 2002).

Encontrada em toda a América tropical e subtropical é amplamente distribuída em todo o território brasileiro, como planta espontânea em terrenos abandonados ou cultivada em hortas medicinais. A espécie é amplamente utilizada para dores abdominais como digestivas, sendo consumida principalmente nas formas de chás produzidos a partir das folhas. Indicada como estimulante digestivo e também como antidepressiva, seu uso prolongado em doses elevadas por via oral pode causar irritação gástrica, bradicardia e hipotensão (TESKE, 1995). Também pode ser usada na forma de compressas para combater hemorróidas; maceradas, para o uso local, contra dor de dente; e em forma de banhos, como febrífuga. A infusão alcoólica

friccionada é recomendada para combater resfriados e a raiz é usada no Nordeste como aperiente e no combate às afecções hepáticas. Testes farmacológicos realizados comprovaram atividades analgésica, espasmolítica, antibacteriana e peitoral (CORRÊA, 1992; CARRICONDE, 1996; MELO e XAVIER FILHO, 2000).

As plantas utilizadas nesse estudo foram coletadas na horta medicinal do Laboratório de Fitoterapia da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), onde a espécie é cultivada em regime padronizado para a produção de fitoterápicos (Figuras 1, 2). A confirmação da identificação botânica foi realizada pela Dra. Rita de Cássia A. Pereira curadora do Herbário Dárdano de Andrade Lima (IPA), onde um exemplar da espécie foi depositado sob o n° 61004.



Figuras 1, 2: A espécie *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown na horta medicinal do Laboratório de Fitoterapia da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária

Apesar de relativamente bem estudada sobre os mais variados aspectos morfológicos, químicos e farmacológicos a espécie ainda carece de estudos elucidativos que comprovem, por exemplo, atividades antimicrobiana, citotóxica, antitumoral, antiinflamatória e possíveis efeitos tóxicos para extratos brutos e compostos químicos presentes em suas raízes, caules e folhas. Diante do exposto, objetivou-se neste estudo, contribuir para um maior conhecimento da farmacologia da espécie, avaliando-se ações antimicrobiana, citotóxica, antitumoral e antiinflamatória para extratos brutos de plantas cultivadas, tomando-se por base a importância

da padronização do cultivo para garantir a produção de princípios ativos que justifiquem o uso medicinal da espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Um grande número de publicações envolvendo estudos agrônomo, químico e farmacológico de *L. alba* foram registradas no período de 1971 a 2006.

Devido a grande importância medicinal de *L. alba*, seu intenso uso popular e sua comercialização, estudos sobre a composição química da *L. alba* relacionaram a composição dos óleos essenciais com aspectos agrônomo, tais como, cultivo das plantas a sombra ou ao sol, época de colheita, produção de biomassa, produção de óleo essencial e propagação *in vitro* da espécie. Entre as publicações envolvendo aspectos agrônomo destacamos:

Os estudos da influência da adubação orgânica na produção de biomassa e no teor de óleo essencial de *L. alba* que foram realizados por Ming (1992), mostrando que o acréscimo de adubo orgânico aumenta a produção de biomassa e diminui o teor de óleos essenciais da espécie.

O efeito do ácido giberélico (GA₃), ácido 2-cloretil-fosfônico e cloreto de 2-cloretil-trimetil amônio (CCC) sobre os atributos da biometria e suas implicações no crescimento, produção de biomassa e teor de óleos essenciais em diferentes épocas do ano, foram observados por Stefanini (1997). Os fitorreguladores não causaram aumento efetivo dos índices biométricos, dos parâmetros fisiológicos, da produção de biomassa e do teor de óleo essencial, não justificando sua aplicação, considerando-se a relação custo/benefício.

A produção de óleos essenciais das folhas de *L. alba* cultivada em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita, foram analisadas por Ventrela em 2000. O estudo constatou uma melhor adaptação da planta às condições de alta intensidade luminosa. Os compostos químicos apresentaram alta correlação com os níveis de sombreamento e épocas de colheita. Estudos feitos para determinar a melhor época de colheita para a produção de biomassa e rendimento dos óleos essenciais, foram feitos por Castro, em 2001. Os resultados mostraram que uma maior produção de biomassa foliar e rendimento de óleos essenciais ocorreram na primavera e no verão. Com relação à colheita houve maior produção de biomassa foliar e de rendimento de óleo essencial na porção apical dos ramos, seguido pela parte mediana e basal. As temperaturas de secagem menores ou iguais a 40°C proporcionaram maiores rendimentos dos óleos essenciais.

Estudos fenológicos e de propagação realizados para a espécie sob condições de cultivos padronizados em um substrato constituído por uma mistura de terra e húmus de

minhoca (2:1), referem como única forma de propagação da espécie a estaquia, com um percentual de pegamento das mudas igual a 95% e brotamento das estacas dentro seis a quatorze dias do plantio. As mudas com 27 dias de cultivo iniciaram a floração e com seis meses atingiram a altura máxima de 2,14m (COSTA et al., 2001).

A micropropagação *in vitro* de *L. alba* estudada por Grupta et al. em 2001, permitiu aos autores verificarem que a morfologia e a composição química dos óleos essenciais das plantas micropropagadas, eram idênticas aquelas das plantas propagadas vegetativamente.

Dando continuidade aos estudos sobre a produção de biomassa, rendimento dos óleos essenciais de *L. alba* em diferentes épocas do ano e em diferentes partes da planta (apical, mediana e basal), Castro et al., em 2002, observaram que as partes apical e mediana representaram cerca de 80% da massa das folhas frescas. O rendimento da biomassa foliar foi aproximadamente de 5ton/ha nas quatro estações do ano. Os rendimentos médios dos óleos essenciais nas três partes da planta foram 0,15%, 0,47%, 0,46%, 0,55% no outono, inverno, verão e primavera de 1998 e 0,61% para o verão de 1999. Os óleos essenciais mostraram uma semelhança na composição química em relação com a sazonalidade.

Estudos realizados por Ricciardi e Ricciardi (2002) mostraram que o conteúdo de citral (neral e geranial - aproximadamente 33% e 66% respectivamente), diminui à medida que a planta alcança o seu máximo desenvolvimento, sendo mantida a relação neral e geranial. Por outro lado, o conteúdo de linalol sofre um incremento bastante acentuado. Os autores referem que essas variações afetam os caracteres organolépticos do óleo essencial, sendo o aroma que caracteriza os exemplares concentrado no verão, do tipo cítrico, enquanto que exemplares colhidos no outono e primavera apresentam aromas mais suaves. Os sesquiterpenos como β -cariofileno e o germacreno D, não sofreram influências climatológicas importantes, mantendo-se quase totalmente constantes em seu conteúdo.

Estudos fitoquímicos e para determinar os intervalos de colheita foram realizados por Ehlert et al. (2002). A maior produção de biomassa foi observada aos 145 dias (0,7 ton/ha); o maior teor de óleo essencial aos 160 dias com 2,34% em base seca; alta produção de carvona foi observada aos 40 e 55 dias (60%) decaindo ao longo dos intervalos de colheita e estabilizando-se por volta de 130 dias (52%); a produção de limoneno foi crescente ao longo dos intervalos (21% - 29%); e nos três últimos intervalos de colheita observou-se tendência de estabilidade de ambas as substâncias. Nenuma interferência na produtividade de biomassa e na proporção relativa da carvona e do limoneno, foi produzida pelos intervalos de colheita.

A influência de três tipos de adubação (terra pura, adubação química e adubação orgânica) sobre o rendimento de óleo essencial das folhas de *L. alba* foi avaliada por Sousa et

al. 2002. O óleo essencial não apresentou modificações significativas em resposta às alterações de adubação.

Estudos dos aspectos fitotécnicos do quimiotipo de *L. alba* que apresenta alto conteúdo de citral e limoneno foram realizados por Nagão (2003). Os resultados mostraram que o período de secagem natural e época de colheita influenciou no teor de óleo essencial; a colheita da espécie deve ser realizada entre 15:00 e 17:00 horas para obter o maior teor de óleo essencial e garantir o maior teor de citral e limoneno, nas estações seca e chuvosa; ocorreu um decréscimo de biomassa total à medida que aumenta a dose de adubo orgânico e altura de corte no primeiro corte; no segundo corte à medida que aumenta a dose de adubo orgânico decresce o rendimento da biomassa foliar e a altura do corte favoreceu o aumento de biomassa foliar; a produtividade e o teor de óleo essencial aumenta com o uso de adubo orgânico e altura de corte, sendo que a percentagem de citral aumenta com o uso de adubo orgânico e a altura do corte não apresenta nenhum efeito.

Os efeitos da adubação orgânica e das alturas de corte em *L. alba* (quimiotipo limoneno-carvona) na produção de matéria seca foliar e de óleo essencial foram avaliados por Santos e Innecco (2004). Os resultados mostraram que a adubação não influenciou significativamente a produção de biomassa foliar e de óleo essencial, não afetou a produção de limoneno, além de influenciar negativamente a produção de carvona. Entre as alturas de corte testadas, 45 cm é a que resultou na maior produção de biomassa foliar por área e, 30 e 45 cm são equivalentes quanto ao rendimento de óleo essencial por área. As maiores produções de limoneno podem ser obtidas com corte à altura de 30 cm e carvona com corte à altura de 15 cm.

Análises dos óleos essenciais das folhas de três quimiotipos (citral, carvona e linalol) de *L. alba*, provenientes do Estado do Rio de Janeiro, Ceará e São Paulo cultivadas em condições semelhantes foram feitas por Tavares et al. (2005), a fim de verificar se as diferenças na composição de óleo essencial devem-se a fatores ambientais ou a variação genética infraespecífica e se a floração influencia o rendimento. Os resultados mostraram que a quantidade de óleo essencial de folhas, extraído por hidrodestilação variou de acordo com a época do ano e que o menor rendimento foi observado na época em que as plantas encontravam-se em floração. A diversidade na composição do óleo essencial do quimiotipos estudados não se deve a fatores ambientais e sim a diversidade no genótipo da planta. A análise qualitativa dos óleos essenciais obtidos na época de floração e na época de crescimento vegetativo não houve variação qualitativa dos componentes majoritários e na

análise quantitativa mostrou que a percentagem de citral, carvona e linalol sofreu uma pequena diminuição durante a época de floração.

Estudos de cultivo, propagação e rendimento de extratos brutos de *L. alba* foram realizados por Aguiar et al. (2006). As plantas produzidas por estaquias foram cultivadas em canteiros parcialmente sombreados com substrato constituído por uma mistura de terra e húmus de minhoca. Os resultados mostraram que nas condições de cultivo descritas, as plantas desenvolveram-se satisfatoriamente exibindo ao término de seis meses uma altura máxima de 2,14m, tal como descrito por Carriconde et al., 1996 e Matos, 1998. O material botânico coletado (raiz, caule e folha), após a extração apresentou o seguinte rendimento: a partir de 290g de raízes frescas, foram obtidos 165g de material seco triturado e 39,67g de extratos brutos; a partir de 1060g de caules frescos foram obtidos 475g de material seco triturado e 39,85g de extrato bruto; a partir de 1225g de folhas frescas foram obtidos 85g de material seco e 15,61g de extrato bruto. A raiz de *L. alba* mostrou o melhor rendimento de extratos brutos, em relação ao caule e a folha. Extrações das folhas e dos caules, utilizando o metanol como solvente, apresentaram melhor rendimento que as realizadas com acetona, clorofórmio, etanol e hexano e para as raízes extratos produzidos com etanol apresentou melhor rendimento que com acetona, clorofórmio, metanol e hexano (ANEXO A).

Análises da composição química dos extratos brutos das folhas de *L. alba* mostraram a presença de citral nos extratos aquoso das folhas (CORRÊA, 1992); flavonóides e fenilpropanóides nos extratos hidroalcoólico e aquoso das folhas frescas e secas (FERREIRA et al., 2002); citral, carvona e linalol nos extratos etanólico e do extrato diclorometano das folhas (JULIÃO et al., 2003); alcalóides, flavonóides e taninos nos extratos aquosos das folhas (GAZOLA et al., 2004) (ANEXO B)

Estudos da composição química dos óleos essenciais de raízes, caules e folhas de *L. alba* permitiram identificar os componentes químicos da espécie como sendo: neral, geranial, α -cubebeno, β -cariofileno, γ -terpineno, p -cimeno, mirceno, geraniol, linalol, 1,8-cineol, limoneno, germacreno-D, germacreno D-4-ol, mirteno, mirtenal, 2,6-octadien-1-ol, 3,7-dimetil acetato, 1-octeno-3-ol, 6-metil-5-hepteno-2-one, óxido de cariofileno, citronelol, 3-pipeno-2-ol, β -mirceno, farnesol, espatulenol, citral, lipiol, ácido tânico, L-limoneno, óxido de cariofileno, t-cariofileno, cariofileno, alcalóides, flavonóides, 1,4 cineol, nerolidol, compostos carbonílicos, n-heptano, n-decano, β -elemeno, germacreno, carvona, hidrocarbonos, compostos oxigenados, B-guaieno, limoneno, piperitenona, sabineno, cânfora, B-mirceno, o transcariofileno, canfeno, D-limoneno, piperitone, biciclosequifelandreno e β -borboneno (CRAVEIRO, 1981; GOMES et al., 1993; MATOS, 1996; MATOS et al., 1996; PINO e

ORTEGA, 1996; ALEA et al. 1997; VALE et al., 1998; ZOGHBI et al., 1998; BAHL et al., 2000; MALLAVARAPU et al., 2000; RAO et al., 2000; MELO e XAVIER FILHO, 2000; VENTRELA, 2000; MARTINS et al., 2000; SANTOS-MENDES et al., 2000; MENDES, 2001; LORENZO et al., 2001; SENATORE e RIGANO, 2001; CASTRO, 2001; CASTRO et al., 2002; SINHORIN et al., 2003; STASHENKO et al., 2004, TAVARES et al., 2005) (ANEXO C).

Entre os estudos que referem ações farmacológicas para *L. alba* destacamos Elder et al. (1997), que avaliaram o efeito da mistura dos óleos essenciais obtidos das folhas e das flores de *L. alba* com cremes biológicos, para tratamento de peles secas e envelhecidas. Verificaram que a mistura foi eficaz contribuindo para a coesão das células da pele e promovendo a formação de uma barreira que regulou a perda de umidade transepidérmica.

O efeito dos extratos hidroalcoólicos de *L. alba* a 40% e a 80% sobre o sistema nervoso central de camundongos machos adultos foram estudados por Santos et al. (1998). Os flavonóides presentes nos extratos hidroalcoólicos a 80% podem ser responsáveis pela atividade depressora central em camundongos.

A ação calmante e espasmolítica suaves observadas para extratos das folhas, foram atribuídas à presença do citral e a atividade analgésica do mirceno (MATOS, 1998).

Os efeitos analgésicos dos extratos hidroalcoólicos e de dois quimiotipos das folhas de *L. alba* (quimiotipo I – apresentando alto conteúdo de limoneno e citral e quimiotipo II – apresentando alto conteúdo de carvona) e ação antagonista da naloxone foram estudados por Viana et al. em 1998, em camundongos. Os resultados mostraram inibição dose dependente da contração com as doses de 0,5 e 1mg/kg i.p. e 1 e 2mg/kg v.o., nos quimiotipos I e II respectivamente; os extratos hidroalcoólicos das folhas nas doses menores que 100mg/kg e ambos os quimiotipos nas doses de 0,5 e 1mg/kg i.p. tiveram efeitos antinociceptivos, sendo maior no quimiotipo II e nesse caso não revertido pelo antagonista opióide, naloxone.

A atividade anticonvulsivante dos óleos essenciais de *L. alba* (OE I – contendo citral e β -mirceno; OE II – contendo citral e limoneno; OE III – contendo carvona e limoneno) e de seus compostos isolados foram analisadas por Vale et al. (1998), em camundongos fêmeas. Os resultados mostraram que os óleos essenciais (50, 100, 200 e 400mg/kg i.p. ou 200 e 400mg/kg v.o.) e o citral (100mg/kg i.p. ou 200mg/kg v.o.) apresentaram efeito anticonvulsivante; os óleos essenciais I e II potencializam o efeito do diazepam na proteção das convulsões induzidas com o pentilenotetrazol e provavelmente o efeito obtido está relacionado com a ação dos constituintes ativos no sistema GABAérgico. No ano seguinte, Vale (1999), realizou estudos comparativos dos óleos essenciais de três quimiotipos de *L.*

alba e constatou que os óleos essenciais apresentam efeitos analgésico (provavelmente relacionado com mediadores inflamatórios), ansiolítico, depressor central, relaxante muscular e na diminuição de temperatura retal, que podem estar associados a uma atuação sinérgica entre o citral, mirceno e limoneno.

Em 2000, Zétola utilizou soluções extrativas de *L. alba* com etanol a 40, 60 e 80%, para avaliar ações sedativa e anticonvulsivante em camundongos. A solução a 80% de etanol foi a que apresentou efeitos mais significativos de sedação e relaxamento muscular.

O efeito anticonvulsivante dos óleos essenciais de três quimiotipos de *L. alba*, já referidos por Vale et al. (1998), foram estudados por Barros et al. em 2000, os quais verificaram que a associação dos óleos essenciais com o diazepam promoveu um efeito significativamente potencializador, em fêmeas de ratos, sendo o citral, o β -mirceno e o limoneno, os prováveis componentes ativos dos óleos essenciais.

Avaliação da atividade ansiolítica dos principais compostos químicos (citral, limoneno e mirceno) do óleo essencial das folhas de *L. alba* em camundongos machos, tentando relacionar o efeito desses constituintes ao óleo essencial foi realizada por Furtado et al. (2000). Os resultados obtidos não permitiram associar o efeito ansiolítico do óleo essencial de *L. alba* aos seus principais constituintes químicos.

A atividade antiviral *in vitro* de extratos hidroalcoólicos das folhas de *L. alba* a 80% e a 40%, contra a replicação do vírus herpético do tipo 1 (HSV-1) – cepas KOS, VR733 e 29R/resistente ao aciclovir e o vírus da poliomelite tipo 2 (polio-2) foi avaliada por Bettega et al. (2000). A inibição da replicação do HSV – 1 foi detectada apenas para a cepa 29R, quando testada frente ao extrato hidroalcoólico a 80% e a 40% reextraído com n-butanol e água, respectivamente, enquanto que a replicação do polio-2 foi inibida pelos extratos hidroalcoólico a 80% e a 40% reextraídos com diclorometano e acetato de etila.

Atividade antiulcerogênica de *L. alba* estudada por Pascual et al. em 2001, mostrou que tal atividade apresentada pela infusão das folhas, não modificou o pH gástrico e a acidez total em ratos machos Wistar.

Estudo realizado por Soares (2001) avaliou as atividades antinoceptiva das soluções extrativas hidroalcoólicos de *L. alba* a 40 e a 80% obtidas por maceração e anticonvulsivante soluções extrativas hidroalcoólicos de *L. alba* a 70, 80 e 90% obtidos por maceração e percolação. A solução extrativa a 40% apresentou a melhor ação antinoceptiva enquanto que a solução extrativa a 90% na dose de 200mg/kg mostrou o melhor resultado na atividade anticonvulsivante.

A presença do citral e do linalol e suas variações inversas justificaram a atuação da espécie no sistema nervoso, já que ambos os compostos principalmente o linalol têm o efeito sedativo. As variações observadas não afetaram o uso da planta como digestiva e a quantidade de óleo essencial presente nas infusões não é significativa para promover efeitos tóxicos (Ricciardi e Ricciardi, 2002).

Ações do citral, mirceno e limoneno (constituintes do óleo essencial de um quimiotipo de *L. alba*) sobre o sistema nervoso central, avaliadas por Vale et al. em 2002, mostraram que todos estes componentes apresentaram efeitos sedativo e relaxante motor. Em altas doses, produziram uma potencialização do sono induzido pelo pentobarbital em camundongos, o que foi mais intenso na presença de citral. Nenhum dos componentes mostrou efeito ansiolítico.

Avaliação da atividade anticolinesterase de componentes extraídos de algumas plantas entre as quais representantes do gênero *Lippia* (*Lippia alba* e *Lippia sidoides*) para o tratamento da doença de Alzheimer feitas por Trevisan e Macedo em 2003, mostraram que extratos metanólico e etanólico das folhas de *L. sidoides* inibiram 60% e 77% respectivamente, a enzima acetilcolinesterase. Esses percentuais de inibição, segundo os autores, são indicativos para um aprofundamento dos estudos através do fracionamento dos extratos. Já os extratos hexânico e etanólico das folhas de *L. alba* não apresentaram percentuais de inibição.

O efeito do extrato bruto de *L. alba* no crescimento e diferenciação de *Herpetomonas samuelpessoai* foi avaliada por Holetz 2003. Os resultados mostraram efeito antiprotozoário positivo na concentração de 1.000mg/mL, com 90,7% de inibição do crescimento e podem estimular a diferenciação celular do protozoário na forma paramasigota em 22%.

Estudos comparativos da constituição química volátil e não volátil das folhas provenientes de três quimiotipos de *L. alba* cultivados no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Ceará, foram realizado por Barbosa 2003 e mostraram que os óleos essenciais dos três quimiotipos apresentaram atividade fitonematicida (*Meloidogyne incognita*); dois dos quimiotipos apresentaram atividade larvicida contra o *Aedes aegypti* e um outro mostrou atividade antinociceptiva.

A atividade antimicrobiana de *L. alba* foi relativamente bem estudada durante o período de 1971 a 2006, com publicações relatando ação antibiótica para extratos brutos, óleos essenciais e néctar das flores da espécie.

Screening de 68 plantas que são utilizadas na Guatemala no tratamento de doenças respiratórias, foram realizados por Cáceres et al. em 1991. Três bactérias Gram-positivas que causam infecções respiratórias (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus*

pneumoniae) foram utilizadas nos testes para verificação da atividade antimicrobiana das plantas selecionadas para o estudo. Entre as plantas originárias da América com grande atividade antibacteriana destacaram-se duas espécies do gênero *Lippia* (*Lippia alba* e *Lippia dulcis*). *L. alba* inibiu principalmente *S. aureus* e *S. pneumoniae* e moderadamente *S. pyogenes* enquanto que *L. dulcis* inibiu mais efetivamente *S. pneumoniae* e *S. aureus* e não inibiu *S. pyogenes*.

A atividade antifúngica dos extratos acetônico, etanólico, metanólico e aquoso de folhas secas de *L. alba* sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz), isolado de *Citrus sp.* foi verificada por Santos (1996).

Óleos essenciais de *L. alba* extraídos de toda a planta por Alea et al. em 1997, foram ativos sobre bactérias de interesse clínico principalmente frente a bactérias Gram-positivas. Concentrações inibitórias mínimas variaram entre 0,3 e 0,63µg/mL. Apenas *Pseudomonas aeruginosa* mostrou-se resistente às diferentes concentrações testadas e o *S. aureus* foi inibido com a menor concentração.

A atividade de óleos essenciais e exsudatos de *L. alba* sobre fungos isolados de frutas *in natura* (acerola, laranja, mamão, manga e tomates), foram analisados por Oliveira em 2000, que testou os óleos essenciais com atividade antifúngica para aumentar o tempo de vida útil dessas frutas. Os resultados mostraram efeito inibidor sobre o *Geotricchum spp.*

Também visando avaliar atividade antifúngica para o óleo essencial das folhas de *L. alba*, Rao et al. em 2000, detectaram vapores do óleo com forte atividade antifúngica contra patógenos da cana-de-açúcar. O óleo mostrou-se altamente efetivo no controle da germinação de teleosporos de *Ustilago scitaminea* e conídios de *Colletotrichum falcatum* e *Curvularia lunata* na concentração de 3x10(3)µl/L. Também mostrou efeito superior a fungicidas comerciais no controle de fungos patogênicos de plantas.

Atividade antibacteriana do mel produzido a partir do néctar das flores de *L. alba* foi avaliada por Camargo em 2001. O estudo foi realizado através da técnica de diluição da amostra de mel em meio de cultura líquido em concentrações a partir de 5% a 80% (v/v). Semeadura em placas de Mueller-Hinton ágar foi feita, para determinação da concentração bactericida mínima (CBM) das linhagens padrão de *S. aureus* e *Escherichia coli*. Os resultados mostraram que a concentração inibitória mínima (CIM) para *S. aureus* foi de 45% (ação bacteriostática) e 60% o valor para CBM. Para *E. coli* verificou-se que o valor da CIM foi de 35% e de 60% para a ação bactericida.

Soluções extrativas hidrolcoólicas de *L. alba* a 80%, obtida por maceração e suas frações acetato de etila e n-butanol inibiram *S. aureus* (SOARES, 2001).

Screening de plantas usadas na medicina popular brasileira para tratamento de doenças infecciosas realizado por Holetz et al. em 2002. Extratos hidroalcoólicos das folhas de *L. alba* foram testados frente a *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsioli* e *Candida tropicalis*, os resultados mostraram uma concentração inibitória mínima (CMI) moderada no valor de 125µg/mL para *C. krusei* e CMI maiores que 1.000µg/mL para os outros microrganismos, considerada pelo autor como inatividade dos extratos. Resultados esses que também foram verificados por Pessini et al. (2003) ao utilizarem extratos hidroalcoólico das partes aéreas de *L. alba*.

A atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos e óleos essenciais das folhas de *L. alba* frente a *C. albicans* foi avaliada por Duarte et al. (2005). Os resultados mostraram uma moderada CMI com valor de 0,6mg/mL para os óleos essenciais e fraca CMI com valor maior de 2,0mg/mL para os extratos etanólicos das folhas.

A atividade citotóxica de extratos brutos de *L. alba* foi pela primeira vez investigada no ano de 2004, tendo sido relatado a maior citotoxicidade de extratos clorofórmicos da raiz frente as células NCI-H292 (obtidas a partir de um carcinoma de pulmão humano) e extratos etanólicos das folhas frente as células HEp-2 (derivadas de tumor primário de laringe humana) (COSTA et al., 2004).

Como a relação a atividade antitumoral de *L. alba*, apenas uma publicação Abraham et al. (1979), relacionaram uma possível atividade antitumoral para extratos aquosos, alcoólicos e acetônicos do caule e da folha, que apresentaram ação citostática frente a *Neurospora crassa*.

Do mesmo modo que a atividade citotóxica e antitumoral, a ação antiinflamatória para extratos brutos de *L. alba* tem sido pouco estudada entre o período de 1971 a 2006.

Os efeitos antiedematogênicos dos óleos essenciais e do extrato hidroalcoólico de *L. alba* foram avaliados por Viana et al. (1998). Os resultados comprovaram o efeito antiedematogênico dos óleos essenciais que contém alto conteúdo de limoneno e citral (10 e 50mg/Kg v.o) e do extrato hidroalcoólico das folhas de *L. alba*, com dose menor que 100mg/Kg, no modelo de edema de pata induzido pela carragenina ou dextran, em ratos. Entretanto, nas mesmas doses o óleo essencial que contém alto conteúdo de carvona foi mais efetivo contra o edema de pata induzido só pelo dextran.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Determinar atividades antimicrobiana, citotóxica, antitumoral e antiinflamatória para extratos brutos de *L. alba*, produzidos a partir de plantas cultivadas sob condições padronizadas para produção de fitoterápicos.

3.2 Específicos

- Detectar atividade antimicrobiana para extratos brutos de *L. alba* frente a microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos, álcool ácido resistente, fungo filamentoso e levedura;
- Determinar a citotoxicidade de extratos brutos de *L. alba* em células HeLa (adenocarcinoma da cérvix humana);
- Avaliar a atividade antitumoral de extratos brutos de *L. alba* em Sarcoma 180;
- Estudar a ação antiinflamatória de extratos brutos de *L. alba* através do teste do bolsão de ar estéril.

4 REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, A. M. L.; HERNANDEZ, N. M. R.; MISAS, C.A. J. Extractos de plantas con propiedades citostáticas que crecen en Cuba. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 31, n. 2, p.105 – 111, 1979.
- AGUIAR, J. S. et al. Cultivo, propagação e rendimento de extratos brutos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. In: CONGRESSO NORDESTINO DE ECOLOGIA, 11, 2006, Recife. **Anais...**Recife, 2006. CD-ROM.
- ALEA, J. A. et al. Composición y propiedades antibacterinas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Revista Cubana de Farmácia**, v. 30, n. 1, p. 29-35, 1997.
- AWADH ALI, N. A. et al.. Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 173 – 179, 2001.
- BAHL, J. R. et al. Composition of linalool rich essential oil from *Lippia alba* grown in Indian plants. **Flavour and Fragrance Journal**, v.15, n. 3, p.199-200, 2000.
- 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. 280f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal do Ceará, Ceará.
- BARROS, V. G. S. et al. Anticonvulsant activity of essential oil and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, n. 11, p. 1314 – 1317, 2000.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991. v.3.
- BETTEGA, J. M. R. et al. Avaliação da atividade antiviral de extratos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. ex Britt & Wils (Verbenaceae). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16, Recife. **Resumos...** Recife: UFPE, 2000. p. 265.
- CACERES A. et al. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 31, n. 2, p. 193-208, 1991.
- CAMARGO, R. C. R. **Biologia Floral da *Lippia alba* (Verbenaceae), atividade antibacteriana e caracterização de amostras de méis de *Apis mellifera* L.** 2001. 99f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.
- CARRICONDE, C. et al. **Plantas medicinais e alimentícias.** Olinda: Centro Nordeste de Medicina Popular; Universidade Federal Rural de Pernambuco. v.1, 1996.
- CASTRO, D. M. **Efeito da variação sazonal, colheita selecionada e diferentes temperaturas de secagem sobre a produção de biomassa, rendimento e composição de óleos essenciais das folhas *Lippia alba*.** 2001. 134f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

CASTRO, D M.; MING, L. C. E.; MARQUES, M. O. M. Biomass production and chemical composition of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Ex Bitt & Wilson in leaves on different plant parts in different seasons. **Acta Horticulturae**, v. 1, n. 51, 2002. Disponível em: <www.actahort.org/books/569/569_18.htm>. Acesso em: 04 dez. 2002.

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

COSTA, M. C. C. D. **Aspectos Farmacológicos de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae): atividade antimicrobiana, citotóxica e antitumoral**. 2002. 124f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

COSTA, M. C. C. D.; AGUIAR, J. S.; PINTO, J. C. Aspectos Fenológicos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 52, 2001. **Resumos...** João Pessoa: UFPB, 2001, p.168.

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 Farmaceutica Boanerense**, v. 23, n. 3, p. 349 - 352, 2004.

CRAVEIRO, A. A. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: UFC, 1981. 210p.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência, um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996. 229p.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

EHLERT, P. A. D. et al. Influência dos intervalos de colheita sobre aspectos agrônômicos e fitoquímicos da *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17; 2002, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: 2002. CD-ROM.

ELDER, H. V. et al. Cosmetologic uses of essential oil of *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown (Lipia). **Rivista Italiana EPPOS**, p. 712-714, 1997.

FERREIRA, J. L. P. et al. Variação Sazonal de flavonóides e fenilpropanóides em *Lippia alba*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17; 2002, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: 2002. CD-ROM.

FURTADO, E. C. et al. Avaliação da atividade ansiolítica do citral, limoneno e mirceno. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16, 2000, Recife. **Resumos...** Recife: UFPE, 2000. p. 210.

GAZOLA, R. et al. *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats. **Pharmacological Research**, v. 50, n. 5, p. 477 – 480, 2004.

GOMES, E. C. et al. Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 74, n. 2, p. 29 – 32, 1993.

GRUPTA, S. K.; KHANUJA, S. P. S.; KUMAR, S. *In vitro* micropropagation of *Lippia alba*. **Current Science Bangalore**, v. 81, n. 2, p. 206-210, 2001.

HOLETZ, F. B. et al. 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.

HOLETZ, F. B. **Efeito de extratos de plantas medicinais no crescimento, diferenciação e ultraestrutura de *Herpetomonas samuelpessoai***. 2003. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Maringá, Paraná.

JULIÃO, L. S. et al. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. (erva cidreira). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 3, supl., p. 36-38, 2003.

LAPA, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMOES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS, 2004. cap. 11.

LORENZI, H.; MATOS, J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. 512p.

LORENZO, D. et al. Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) N. E: Brown from Uruguay. **Flavour and Fragrance Journal**, v.16, n. 5, p. 356-359, Sept. – Oct. 2001.

MALLAVARAPU, G. R. et al. Essential oil of *Lippia alba*, a rich source of linalool. **Journal of medicinal and aromatic plant sciences**, v. 22, n.1B, p. 765-767, mar. 2000.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 2000. 220p.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. Fortaleza: EUFC, 1998. 220p

MATOS, F. J. A. As ervas-cidreira do Nordeste do Brasil: Estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae); Parte II – Farmacoquímica. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 77, n. 4, p. 137-141, 1996.

MATOS, F.J. A. et al. Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in northeast Brasil. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 8, n. 6, p. 695-698, 1996.

MELO, E. C. C.; XAVIER FILHO, L. **Plantas medicinais de uso popular no estado de Sergipe**. Aracaju: UNIT, 2000. 384p.

MENDES, M. M. E. S. **Caracterização morfoanatômica, fitoquímica e molecular de oito formas de *Lippia alba* (Mill.) E. Br. Ex Britt & Wilson**. 2001. 102f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade estadual de Paulista Julio Filho, Botucatu.

MING, L. C. **Influência de diferentes teores de adubação orgânica na produção de biomassa e teor de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Verbenaceae**. 1992. 206f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Paraná, Paraná.

NAGÃO, E. O. **Estudos de alguns aspectos fitotécnicos de *Lippia alba* Mill. N. E. Br. Quimiotipo Citral/Limoneno.** 2003. 82f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Ceará, Ceará.

OLIVEIRA, A. C. **Atividade de óleos essenciais e exsudatos de plantas sobre espécies fúngicas isoladas de frutas *in natura*.** 2000. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

PASCUAL, M. E. et al. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **II Farmaco**, v. 56, n. 5-7, p. 501-504, 2001.

PESSINI, G. L. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, supl., p. 21-24. 2003.

PINO, J. A.; ORTEGA, A. Chemical composition of the oil of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown from Cuba. **The journal of essential oil research**, v. 8, n. 4, p. 445-446, 1996.

RAO G. P. et al. Studies on chemical constituents and antifungal activity of leaf oil of *Lippia alba* (Mill). **Indian journal of chemical technology**, v. 7, n. 6, p. 332-335. 2000.

RICCIARDI, G. A. L.; RICCIARDI, A. I. A. Efecto de las Variaciones sobre la composición del aceite de plantas de *Salvia morada* de Sáenz Peña. Disponível em: <www.unne.edu.ar/cyt/2001/8-exactas/E-011.pdf>. Acesso em: 04 dez. 2002.

SANTOS, M. M. F. B. **Efeito de extratos de duas formas de *Lippia alba* sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) isolado de *Citrus sp.*** 1996. 105f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Bioquímica de Plantas) – Universidade de São Paulo/Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, São Paulo, 1996.

SANTOS-MENDES, M. M. F. B.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M. Caracterização fitoquímica do óleo essencial de 8 formas de *Lippia alba*, cultivadas em São Manuel – SP. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16; 2000, Recife. **Resumos...** Recife: UFPE, 2000. p. 73.

SANTOS, P. D. et al. Efeito farmacológico de diferentes extratos hidroalcoólicos de *Lippia alba* Miller (Verbenaceae) no comportamento de camundongos. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15; 1998, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia:, 1998. p. 83.

SANTOS, M. R. A.; INNECCO, R. Adubação orgânica e altura de corte da erva-cidreira brasileira. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 182-185, 2004.

SENATORE, F.; RIGANO, D. Essential oil of two *Lippia alba* spp. (Verbenaceae) growing wild in Guatemala. **Flavour and Fragrance Journal**, v.16, n. 3, p. 169 - 171, 2001.

SINHORIN, A. P. et al. Estudo químico de óleos essenciais de *L. alba* por CG-MS. In: ENCONTRO DE QUÍMICA DA REGIÃO SUL, 11, Pelotas, 2003. **Resumos...** Disponível em <[http://www.ufpel.edu.br/iqg/sbqsul/Livro%20parte%206%20\(QO\).pdf](http://www.ufpel.edu.br/iqg/sbqsul/Livro%20parte%206%20(QO).pdf)> . Acesso em: 04 dez. 2002.

SOARES, L. **Estudo tecnológico, fitoquímico e biológico de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown ex Britt. & Wils. (falsa melissa) Verbenaceae.** 2001.112f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, 2001.

SOUSA, L. A. et al. Plasticidade do óleo essencial das folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Ex Britt. & Wilson cultivada em diferentes padrões de adubação. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17, 2002, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: 2002. CD-ROM.

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

STEFANINI, M. B. **Ação de fitorreguladores no crescimento, produção de biomassa e teor de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Verbenaceae em diferentes épocas do ano.** 1997. 132f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Botânica) – Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho, Botucatu.

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

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. **Compêndio de Fitoterapia.** 2. ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1995. 317p.

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

VALE, T. G.; MATOS, F. J. A.; VIANA, G. S. B. Efeito anticonvulsivante do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown e de seus produtos ativos. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15; 1998, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia:, 1998. p. 87.

VALE, T. G. **Estudo farmacológico comparativo de óleos essenciais de quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown.** 1999. 150f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Ceará.

VALE, T. G. et al. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Phytomedicine**, v. 9, n. 8, p. 709 – 714, 2002.

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. 86f. Tese (Doutorado em Agronomia – Horticultura) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

VIANA, G. S. B. et al. Analgesic and Antiinflammatory Effects of two Chemotypes of *Lippia alba*: A Comparative Study. **Pharmaceutical Biology**, v. 36, n. 5, p. 347 - 351, 1998.

ZÉTOLA, M. **Desenvolvimento de preparações extrativas de *Lippia alba* (Miler) N. E. Brown ex Britt & Wlis (falsa-melissa) Verbenaceae.** 2000. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

ZOGHBI, M. D. G. B. et al. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Growing wild in the Brazilian Amazon. **Flavour and fragrance journal**, v. 13, n. 1, p. 47-48, 1998.

5 CAPÍTULO I

**Pharmacologic *screening* of crude extracts of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown
(Verbenaceae).**

Manuscrito submetido ao Periódico Internacional:
Fitoterapia

**Pharmacologic screening of crude extracts of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown
(Verbenaceae).**

J.S. Aguiar ^{a,*}, S.C. Nascimento^a, M.C.C.D. Costa^b, T.G. Silva^a, K.X.F.R. Sena^a.

^aDepartamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Nelson
Chaves, s/n. Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil, 50670-901.

²Departamento de Biologia, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, 526, Boa
Vista, Recife, PE, Brasil, 50050-900.

* Corresponding author: Tel/Fax: +55 81 21268346

E-mail address: jaciana_aguiar@yahoo.com.br (J.S. Aguiar)

Abstract

Crude extracts of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown were evaluated for their antimicrobial, cytotoxic, antitumoral and anti-inflammatory activities. Chloroform, acetone and ethanol extracts of root showed antimicrobial activity front *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Stapylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Monilia sitophila* and hexane, ethanol and methanol extracts of leaves showed antimicrobial activity front *M. luteus*. Ethanol extract of leaves and chloroform extract of roots did not show citotoxicity front HeLa cell line. The verification of the antitumoral activity of ethanol extract of leaves and chloroform extract of roots front Sarcoma 180, and the antiinflammatory activity by air pouch method, in Swiss albino mice (*Mus musculus*) of ethanol extract of leaves and chloroform extract of root, did not show antitumoral activity but showed significant anti-inflammatory activity correspondents to 35.1% for ethanol extract of leaves and 58.7% for chloroform extract of root. Active composites present in leaves and roots of *L. alba* with antimicrobial and anti-inflammatory action, justify its intense popular use and indicate that the standardized conditions of culture, in which the plants are submitted, guarantee the production of these composites.

Keyworlds: *Lippia alba*, Antimicrobial activity, Citotoxic activity, Antitumoral activity, Anti-inflammatory activity.

1. Introduction

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown pertaining to the Verbenaceae family and known as “erva cidreira” and “falsa melissa” is found in all tropical and subtropical America and widely distributed in all the Brazilian territory, in abandoned lands or cultivated in medicinal garden [1]. It is an aromatical shrub, which aroma is related to the predominant constituent in essential oils. The plant can vary qualitatively and quantitatively in function of diverse factors, such as: stations of the year, time of budding, age of the plant, amount of circulating, water of the precipitation, geographic and climatic factors [2, 3].

In folk medicine, the *Lippia alba* (Mill.) has intensive popular use in the treatment of hemorrhoids, tooth ache, fever, cooled and hepatic affection and the species shows some pharmacologic properties previously studied such as analgesic, espasmolitic, antibacterial and pectoral activities [1-3].

Cáceres et al. [4] cited the antimicrobial activity of ethanol extracts of leaves front *Staphylococcus aureus*. Crude extracts and essential oils of the species showed antibiotic activity for different microorganisms [5-8]. Recently, Duarte et al. [9] cited the antimicrobial activity of essential oils of leaves of *L. alba* on *Candida albicans*.

Reference of cytotoxic activity of crude extracts of *L. alba* front NCI-H292 and HEP-2 cell line, was made by the first time for Costa et al. [10] and any study proved, antitumoral activity for the extract. A citation made for Abraham et al. [11] suggests a possible antitumoral activity for aqueous, alcoholic and acetone extracts of stem and leaves of *L. alba* front *Neurospora crassa*.

Antiedematogenic effect of essential oils and hydroalcoholic extract of leaves of *L. alba* containing high levels of carvone, limonene and citral was verified in rats for Viana et al. [12].

This work has as objective to prove antimicrobial activities of crude extracts of *L. alba* kept under standardized conditions of culture and to evaluate cytotoxic, antitumoral and antiinflammatory activities, for crude extracts with better antibiotics actions.

2. Experimental

2.1. Plant materials

The plant was collected in November and December 2004 in medicinal garden of Phytoterapy Laboratory of Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), Brazil and authenticated by the Biologist Dr. Rita de Cássia A. Pereira from the Herbário Dárdano de Andrade Lima (IPA). A voucher specimen number 61004 has been deposited at the Herbarium of the above-cited institute.

2.2. Preparation of the extracts

The hexane, chloroform, acetone, ethanol, methanol and aqueous extracts of root, stem and leaves were prepared according to Zelnik et al. [13]. The hexane, chloroform, acetone ethanol, methanol extracts were prepared by maceration for eight days overnight and the aqueous extract by agitation at 4:00 (200rpm). In both cases, the temperature of extraction was 28-30°C. The extracts were evaporated and the aqueous extract was lyophilized (Labconco, Kansas City, Missouri, USA)

2.3. Microorganisms

Strains of microorganisms used in this study were as follows. *Staphylococcus aureus* UFPEDA 01; *Bacillus subtilis* UFPEDA 16; *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138; *Micrococcus luteus* UFPEDA 06; *Escherichia coli* UFPEDA 224; *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 39; *Serratia marcescens* UFPEDA 398; *Mycobacterium smegmatis* UFPEDA 71; *Monilia sitophila* UFPEDA 2083; *Candida albicans* UFPEDA 1007.

2.4. Neoplastic cell line

The cytotoxicity test was carried through front HeLa cell line (adenocarcinoma cervix human being) obtained from Adolph Lutz Institute (São Paulo, Brazil) and kept in accordance to the established protocol for the Laboratory of cultures of cells in Antibiotic Department of UFPE.

2.5. Animals

Male Swiss albino mice (*Mus musculus*) with 60 days of age, weighing 30 ± 5 g were obtained from the animal house of the Antibiotic Department – UFPE. They were housed in standard environmental conditions of temperature, humidity and under clear and dark cycles of 12 hours. The mice were fed on diet of the animal house (LABINA Purina Brasil) and water *ad libidum*. All procedures described were reviewed and approved by the National Institute of Cancer [14] and with the approval of the Committee of Ethics in Animal Experimentation of UFPE.

2.6. Experimental tumor

The Sarcoma 180 was classified initially as mammary carcinoma, but after some subcutaneous transplantation, it was recognized as one Sarcoma and passed to be called of Sarcoma 180, to have its morphologic characteristics and its behavior [15].

Sarcoma 180, ascitic tumor, was obtained from the Departamento de Antibióticos/UFPE, Brazil. The tumor was maintained in Swiss albino mice in the ascytic form by intraperitoneal transplant (5×10^6 cells).

2.8. Antimicrobial activity

The antimicrobial activity was verified *in vitro*, for the method of diffusion in paper record [16]. The microorganisms were standardized with an optical density of McFarland 0.5 in physiological solution [17], correspondent to a concentration of approximately 10^7 UFC/mL for yeast and filamentous fungi and 10^8 UFC/mL for bacteria.

On the inoculated medium, discs of barren paper (6mm) were placed and absorbed with 10µL of the solution of the extract 200.000µg/mL. After the rank of the discs, the plates were incubated during 24h at 37°C (*S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *M. luteus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*); 48h at 37°C (*M. smegmatis*) and 48h at 30°C (*M. sitophila* and *C. albicans*).

All the crude extracts of *L. alba* were tested front Gram-positive, Gram-negative and alcohol-acid resistant bacteria, filamentous fungi and yeast. The extracts with good antimicrobial activity were retested in triplicate. Equal halos and superiors 10mm had been considered significant of antibiotic activity [18].

The antibiotics Kanamycin and Cetoconazole were used as standards, in the concentrations of 30µg/disc and 300µg/disc, respectively.

The minimum inhibitory concentration (MIC) was applied to the extracts that had proved to be highly effective against microorganisms by the method of dilutions seriate in half solid [19]. Aliquot of different volumes (1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06 and 0.03mL) of a solution 20.000µg/mL was placed in Petri plate and homogenized with 10mL of the appropriate culture medium. The strains were designated arbitrarily on the surface of the medium and the plates were incubated at 37°C and 30°C for 24h and 48h. An inhibition zone of 1000µg/mL or greater was considered inactive front the microorganisms tests [7].

2.9. Cytotoxic activity

The cytotoxic activity was investigated by the MTT method (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolm bromide) [20, 21]. Cell suspensions were diluted to 10⁵ cells/mL, prepared in suitable way and it was distributed in plates of culture with 96 wells (220µl in each well), which was incubated for 24h at 37°C in greenhouse at humid atmosphere with 5% of CO₂ (Sedas, Milão-Itália) After 24h, 22µL of chloroform extract of root and ethanol extract of leaves were added (50.0, 25.0, 12.5 and 6.25µg/mL) and the plates were incubated again at 37°C. Vincristine was used as reference product. At the end of this period, the culture medium

with the MTT excess was inhaled and after that, 100 μ L of DMSO was added to each well for dissolution of Formazan crystals.

The optical density (OD) of the wells was measured at 595 nm with ELX 800 reader and compared to the control.

2.10. Determination of the LD₅₀

The ethanol extract of leaves and the chloroform extract of the root had the LD₅₀ determined in mice [22]. The test groups with 6 animals each received a volume of 10% of the animal weight of ethanol extract of leaves and chloroform extract of root diluted in Tween 80 and salt mine 0.9% and the control group received the vehicle. The animals were observed for one hour and the mortality was followed by 24, 48 and 72h after the administration of extracts.

2.11. Antitumoral activity

Ascytic tumor cells (suspension of 5x10⁶ cells) were inoculated subcutaneously in the axillar region of the healthy animals previously weighed and they were divided into four experimental groups (N 6) [23]. After 24h of the implantation, the treatment was initiated. The test groups received ethanol extract of leaves (113mg/kg $\approx$ 1/4 of LD₅₀) and chloroform extract of root (275mg/kg $\approx$ 1/4 of LD₅₀) diluted in Tween 80 and salt mine 0.9% i.p. and the group control received the vehicle i.p., Actinomycin D (0.3 mg/kg) was used as reference product for seven consecutive days.

On the eighth day, the animals were weighed and sacrificed. The tumors were dissected and weighed. The tumor inhibition was evaluated in accordance to Machon et al. [24].

2.12. Anti-inflammatory activity

The anti-inflammatory activity was evaluated through the air pouch test. The mice were divided into five groups (N 6), anaesthetized with ether, and they received a dorsal

subcutaneous injection of 2,5ml of air on the first day and fourth day. On the seventh day, the treated groups received ethanol extract of leaves (150mg/kg $\approx$ 1/3 of LD₅₀) and chloroform extract of root (367mg/kg $\approx$ 1/3 of LD₅₀) diluted in Tween 80 and salt mine 0.9% i.p.; the control group received the vehicle i.p. The standard group received Phenylbutazone (100mg/kg) diluted in Tween 80 and salt mine 0.9% i.p. After 1h of the administration of the substances, the animals received 1mL of carrageenan 1% in the dorsal region. After 24h of the application of the carrageenan, mice were sacrificed by ether exposure and pouches washes with 3ml of PBS (phosphate buffered solution) containing 0.1% EDTA. The exudates cells were diluted in the Turk's solution (crystal violet 0.01% in acetic acid 3%) and the counting of the number of polymorphonuclear leukocytes was made in the Neubauer hemocytometer [25, 26].

2.13. Statistical analysis

In the antimicrobial activity test, the diameters of the wells were expressed as mean $\pm$ SD of the results obtained in the three repetitions.

The CI₅₀ was determined from a linear regression, which related the percentage of inhibition in function of the logarithm of the tested concentrations, admitting a reliable interval of 99% ($p < 0.01$) [13].

The results of the antitumoral and anti-inflammatory activities were expressed as mean $\pm$ SEM and analyzed using analysis of variance (ANOVA) One-way with $p < 0.05$ considered significant.

3. Results

3.1 Antimicrobial activity

Hexane, ethanol and methanol extracts of leaves showed good activity front *M. luteus*; chloroform, acetone and ethanol extracts of root of *L. alba* were active front *S. aureus*, *M.*

luteus, *B. subtilis*, *M. sitophila* e *C. albicans*. None extract showed activity front *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. marcescens* (Tables 1 and 2).

The lesser values of MIC (31.2µg/ml) were obtained from chloroform extract of root front *B. subtilis* e *M. luteus* and ethanol extract of leaves with MIC of 62.5µg/mL to *M. luteus* (Table 3).

3.2 Cytotoxic activity

The ethanol extracts of leaves and chloroform extract of root of *L. alba* did not show cytotoxic activity front HeLa cells (Table 4).

3.3 LD₅₀

The LD₅₀ values for the ethanol extract of leaves were 460mg/kg and for the chloroform extract of root was 1146mg/kg.

3.4 Antitumoral activity

The results of the antitumoral activity for ethanol extract of leaves (113mg/kg) showed a reduction in the tumor of 47.4%. The chloroform extract of root (275mg/kg) caused an inhibition of 29.3% in the growth of the treated tumor (Table 5).

3.5 Anti-inflammatory activity

The treatment with ethanol extract of leaves (150mg/kg) and chloroform extract of root (367mg/Kg) showed significant anti-inflammatory activity ($p < 0.05$) with inhibition of 58.7% and 35.1% respectively (Table 6).

4. Discussion

The antimicrobial activity of *L. alba*, mainly front Gram-positive bacteria such as in the present study, had already been evidenced for the essential oil of the species [7], for the ethanol extract of leaves front *S. aureus* [4]. The antifungal activity of essential oils of leaves of *L. alba* confirm [6].

The evaluation of the MIC of the extracts of leaves and root of *L. alba*, showed inhibitory concentrations between 31.2 and 1000 µg/mL for *S. aureus* and *B. subtilis*, differing of the results of Holetz et al. [7] and Pessini et al. [8] with MIC values for hydroalcoholic extract of leaves and aerial parts of *L. alba* superior of 1000 µg/mL front those microorganisms.

The chloroform extract of root with the greater antimicrobial activity front *S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *C. albicans* and *M. sitophila* has MIC of 31.2 µg/mL front *M. luteus* and *B. subtilis*, it was related by Costa et al. [10] as a citotoxic activity front NCI-H292 cell line ($IC_{50} = 4,64 \mu\text{g/mL}$), and the ethanol extract of leaves with antimicrobial activity front *M. luteus* and MIC of 62.5 µg/mL, it was also related by Costa et al. [10] as a citotoxic activity front HEP-2 cell line ($IC_{50} = 8,17 \mu\text{g/mL}$). In function of the citotoxicity of those extracts, more studies are necessary to verify other toxic effects in laboratory animals, as well as the orientation of a rational use of the species by the population.

The LD_{50} for the ethanol extract of leaves (460 mg/kg) and for chloroform extract of root (1146 mg/kg), present in this study, do not confirm the value evidenced by Bhakuni et al. [27] which mentioned LD_{50} superior of 1000 mg/kg for the ethanol extracts of the all parts of the plant.

The results of the antitumoral activity with inhibition of 47.4% for the treated tumors with ethanol extract of leaves and of 29.3% for the treated tumors with chloroform extract of root did not show a significant result according to National of Cancer Institute [14], according to which the inferior tumoral inhibitions of 58%, for the treated tumors comparing to the control tumors, is not considered significant. Equally, the cytotoxic activities superior to 30 µg/mL, for the crude extract, and of 4 µg/mL, for pure substances, were standard parameters of non citotoxicity based on the same protocol.

The anti-inflammatory action verified in the present study, mainly for the ethanol extracts of leaves, corroborate to Viana et al. [12], which evidenced the anti-inflammatory activity of *L. alba* in essential oils and hydroalcoholic extracts of the leaves of the species. Viana related the anti-inflammatory activity of the species to the high levels of carvone, limonene and citral, present in the essential oils and probably in the hydroalcoholic extract. A good anti-inflammatory activity observed for the ethanol extracts of leaves, in the present study, indicates a presence of those compounds in the ethanol extract.

References

- [1] Carriconde C, Moraes D. Plantas medicinais e alimentícias. Olinda: Centro Nordestino de Medicina Popular; Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1996. p.53.
- [2] Corrêa CBV. Revista Brasileira de Farmácia 1992; 73: 57.
- [3] Matos FJR. Farmácias Vivas. Fortaleza: EUFC; 1998. p.107.
- [4] Cáceres A, Alvarez AV. J Ethnopharmacol 1991; 31: 193.
- [5] Alea JA, Luis AGO. Revista Cubana de Farmácia 1997; 30: 29.
- [6] Rao GP, Singh M, Singh P, Catalan C, Kapoor IPS, Singh OP et al. Indian J Chem Technol 2000; 7: 332.
- [7] Holetz FB, Pessini GL. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97: 1027.
- [8] Pessini GL, Holetz FB. Revista Brasileira de Farmacognosia 2003; 13: 21.
- [9] Duarte MCT, Figueira GM. J Ethnopharmacol 2005; 97: 305.

- [10] Costa MCCD, Aguiar JS. *Acta Farmaceutica Boanerense* 2004; 23: 349.
- [11] Abraham AML, Hernandez NMR. *J. Rev Cubana Med Trop* 1979; 31:105.
- [12] Viana GSB, Vale TG. *Pharmaceutical Biology* 1998; 36: 347.
- [13] Zelnik, R, Lavie D. *Tetrahedron* 1977; 33: 1457.
- [14] Geran RI, Greenberg NH. *Cancer Chemother Rep* 1972; 3:1.
- [15] Sigiura K. Tumor transplantation. In: Gay, WI. *Methods of Animal experimentation*. New York and London: Academic Press; 1965. p. 171.
- [16] Bauer AW, Kirby WMM. *Am J Clin Pathol* 1966; 45: 493.
- [17] Barry AL. Procedure for testing antimicrobial agents in agar media: theoretical considerations. In: Lorian V (ed), *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Baltimore: Williams & Wilkins;1986. p. 13.
- [18] Chowdhury D, Sayeed A. *Fitoterapia* 2002; 73: 92.
- [19] Carvalho AA, Sampaio, MCC, Sampaio FC, Melo AFM, Sena KXFR, Chiappeta AA, et al. *Acta Farmacêutica Bonaerense* 2002; 21: 255.
- [20] Mosmann T. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55.
- [21] Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL et al. *Cancer Res* 1988; 48: 589.
- [22] Pereira EC, Nascimento SC, Lima RC, Silva NH, Oliveira FM, Bandeira E et al. *Tokai J Exp Clin Med* 1994; 19: 47.

- [23] Ribeiro-Costa RM, Alves AJ, Santos NP, Nascimento SC, Gonçalves CP, Silva NH et al. J Microencapsul 2004; 21: 371.
- [24] Machon Z, Kuczynski L, Gioldanowski J, Wieczorek Z, Zimecki M, Blaszczyk B et al. Arch Immunol Ther Exp 1981; 29: 217.
- [25] Kelmm P, Harris HJ. Eur J Pharmacol 1995; 281: 69.
- [26] Sin YM, Pook SH. Biochem. Physiol. 1997; 116C: 191.
- [27] Bhakuni, DS, Dhar ML. Indian J Exp Biol 1971; 9: 91.

Table 1

Antimicrobial activity of leaves crude extracts *Lippia. alba* (Mill.) N. E. Brown produced from dry plants (2.000µg/disc), inhibition zone (mm).

Microorganisms	Extracts from dry plants (2.000µg/disc)			Standards	
	LH	LE	LM	Kanamycin (30µg/disc)	Cetoconazole (300µg/disc)
	Inhibition zone (mm) ^a			Inhibition zone (mm)	
<i>S. aureus</i>	12,0±0,0	10,3±1,1	11,3±2,1	28	-
<i>M. luteus</i>	20,7±0,6	24,0±1,0	25,0±0,0	34	-
<i>B. subtilis</i>	14,7±1,1	13,0±1,0	12,3±0,6	29	-
<i>P. aeruginosa</i>	n.a.	n.a.	n.a.	20	-
<i>M. smegmatis</i>	9,0±1,0	13,0±1,0	13,3±1,1	40	-
<i>E. faecalis</i>	n.a.	n.a.	n.a.	13	-
<i>E. coli</i>	n.a.	n.a.	n.a.	15	-
<i>S. marcescens</i>	n.a.	n.a.	n.a.	15	-
<i>C. albicans</i>	n.a.	n.a.	n.a.	-	24
<i>M. sitophila</i>	n.a.	n.a.	n.a.	-	22

LH: hexane leaves; LE: ethanol leaves; LM: methanol leaves. n.a. - no activity

^aMeans ± SD

Table 2

Antimicrobial activity of roots crude extracts *Lippia. alba* (Mill.) N. E. Brown produced from dry plants (2.000µg/disc), inhibition zone (mm).

Microorganisms	Extracts dry plants (2.000µg/disc)			Standards	
	RC	RA	RE	Kanamycin (30µg/disc)	Cetoconazole (300µg/disc)
	Inhibition zone (mm) ^a			Inhibition zone (mm)	
<i>S. aureus</i>	24,3±3,0	22,3±2,3	20,3±0,6	28	-
<i>M. luteus</i>	30,0±0,0	27,0±1,7	25,7±2,5	34	-
<i>B. subtilis</i>	23,3±0,6	23,3±0,6	22,0±1,0	29	-
<i>P. aeruginosa</i>	n.a.	n.a.	n.a.	20	-
<i>M. smegmatis</i>	19,3±1,1	13,7±1,5	9,3±1,5	40	-
<i>E. faecalis</i>	n.a.	n.a.	n.a.	13	-
<i>E. coli</i>	n.a.	n.a.	n.a.	15	-
<i>S. marcescens</i>	n.a.	n.a.	n.a.	15	-
<i>C. albicans</i>	20,0±1,0	14,3±0,6	9,7±0,6	-	24
<i>M. sitophila</i>	17,3±1,5	n.a.	n.a.	-	22

RC: chloroform roots; RA: acetone roots; RE: ethanol roots. n.a. - no activity.

^a Means ± SD

Table 3

Values of the minimum inhibitory concentrations (MIC) in $\mu\text{g/mL}$ for crude extracts of root and leaf of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown front to the microorganisms tests

Microorganisms	Extracts dry plants					
	($\mu\text{g/mL}$)					
	LH	LE	LM	RC	RA	RE
<i>S. aureus</i>	n.t.	n.t.	n.t.	500	250	1000
<i>M. luteus</i>	500	62,5	250	31,2	125	125
<i>B. subtilis</i>	n.t.	n.t.	n.t.	31,2	250	250
<i>M. smegmatis</i>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>C. albicans</i>	n.t.	n.t.	n.t.	2000	n.t.	n.t.
<i>M. sitophila</i>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.

Extracts: LH: hexane leaves; LE: ethanol leaves; LM: methanol leaves; RC: chloroform roots; RA: acetone roots; RE: ethanol roots; n.t. – not tested

Table 4

Cytotoxic activity of extracts ethanol of the leaf and chloroform of the root of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown front the HeLa cell.

EXTRACTS	Cell Line
	IC ₅₀ (µg/mL)
	HeLa
LE	>30
RC	>30
Vincristine	0.13

Extracts: RC: chloroform roots; LE: ethanol leaves.

p<0.01

Table 5

Antitumoral activity of extracts ethanol of the leaf and chloroform of the root of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown.

Groups	Dose (mg/kg)	Inhibition (%)
Control	-	0
LE	113	47,4
RC	275	29,3
Actinomycin D	0.3	87

Extracts: RC: chloroform roots; LE: ethanol leaves.

p<0.05

Table 6 Anti-inflammatory activity of extracts ethanol of the leaf and chloroform of the root of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown.

Groups	Dose	PMNL ($\times 10^6/\text{mL}$) ^a	Inhibition (%)
	(mg/kg)	(n=6, after 24 h)	
Control	-	5,25 $\pm$ 0,2	-
LE	150	3,41 $\pm$ 0,1	35,1
RC	367	2,17 $\pm$ 0,2	58,7
Phenilbutazone	100	1,55 $\pm$ 0,2	70,5

RC = Extract chloroform of root; FE = Extracts ethanol of leaf;

PMNL = polymorphonuclear leukocytes.

^aMeans $\pm$ SEM

p<0.05.

6 CAPÍTULO II

Atividade Antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae)

Manuscrito submetido ao Periódico Nacional:
Revista Brasileira de Farmacognosia

Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown - Verbenaceae

Jaciana S. Aguiar^{1*}, Maria C. C. D. Costa², Silene C. Nascimento¹, Kêsia X. F. R. Sena¹.

^{1*}Departamento de Antibióticos, CCB, Universidade Federal de Pernambuco,

Rua Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil, 50670-901

²Departamento de Biologia, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, 526, Boa Vista, Recife-PE, Brasil, 50050-900.

RESUMO: A atividade antimicrobiana de extratos brutos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown foi verificada *in vitro*, frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Mycobacterium smegmatis*, *Candida albicans* e *Monilia sitophila*. A concentração inibitória mínima (CMI) foi determinada para os extratos que exibiram melhores atividades. A razão da zona de inibição (mm) produzida pelos extratos e a zona de inibição (mm) em torno da Kanamicina (30µg/disco) e Cetoconazol (300µg/disco), foram usados como referências para expressar atividade antimicrobiana. Os testes foram feitos em triplicata e os resultados são representados pela média e desvio padrão dos três experimentos. Entre os microrganismos mais sensíveis destacaram-se *M. lutes* frente aos extratos de folha e raiz; *B. subtilis* e *S. aureus* frente aos extratos de raiz. A menor concentração inibitória (CMI = 31,2 µg/mL), foi obtida para o extrato clorofórmico da raiz frente a *B. subtilis* e *M. luteus*.

Unitermos: Atividade antimicrobiana, *Lippia alba*, Planta Medicinal.

*E-mail: jaciana_aguiar@yahoo.com.br, Tel/Fax: (0xx81) 21268346

An antimicrobial activity of crude extracts of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown was verified *in vitro*, against the following bacterial strains: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Mycobacterium smegmatis*, *Candida albicans* and *Monilia sitophila*. A minimum inhibitory concentrations (MIC), was determinated for the best extracts. The ratio of the inhibition zone (mm) produced by the plant extract and the inhibition zone around the Kanamicina (30µg/disco) and Cetoconazol (300µg/disco) was used to express antibacterial activity. The test was made using three repetitions and the results given are the mean $\pm$ S.D., of three experiments. Among the microorganisms most sensible had been notable *M. luteus* against to the extracts of the leaf and root; *B. subtilis* and *S. aureus* against to the extracts root. The cloroformic extract of root showed maximum inhibitory activity against *B. subtilis* and *M. luteus* (MIC =31.2 µg/mL).

Keywords: Antimicrobial activity, *Lippia alba*, Medicinal plant

INTRODUÇÃO

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown, planta da família Verbenaceae, apresenta porte arbustivo, medindo até dois metros de altura, com ramos finos de coloração esbranquiçada exibindo folhas elípticas com bordos serrados e filotaxia opostas dística. As flores são pequenas de coloração que varia do branco ao lilás e reunidas em inflorescência capituliformes.

O nome popular “cidreira”, empregado no Brasil para designar espécies aromáticas de várias famílias botânicas, também é utilizado para *L. alba*. Os aromas estão relacionados aos constituintes químicos predominantes nos óleos essenciais, os quais variam qualitativamente e

quantitativamente, em função das estações do ano, época da floração, idade da planta, quantidade de água circulante, fatores geográficos e climáticos (Corrêa, 1992).

Em 1991 Cáceres et al., citaram pela primeira vez a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das folhas frente à *Staphylococcus aureus* e dez anos mais tarde, a ação antimicrobiana de soluções extrativas hidroalcoólicas a 80% foi verificada frente a *S. aureus* (Soares, 2001). Extratos brutos, óleos essenciais e mel do néctar das flores mostraram, atividade antibiótica para diferentes microrganismos (Santos, 1996; Alea et al., 1997; Oliveira, 2000; Rao et al., 2000; Camargo, 2001; Holetz et al., 2002; Pessini et al., 2003; Barbosa, 2003). Mais recentemente, Duarte et al. (2005), referiram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas de *L. alba* sobre *Candida albicans*.

Além de ações antimicrobianas outras propriedades farmacológicas são atribuídas a *L. alba*. Quando utilizada na forma de chás, macerada em compressa e banhos, a espécie apresenta propriedades antiespasmódica, antipirética, antiinflamatória, enemagoga, diaforética, analgésica e sedativa. Tais propriedades devem-se aos seus constituintes ativos, dentre eles o óleo essencial (Julião et al., 2003).

Considerando os estudos já realizados para verificação de ação antimicrobiana de extratos brutos e óleos essenciais de *L. alba*, nos quais ficaram evidente a necessidade de mais estudos que comprovem esta atividade, objetivamos neste estudo, comprovar a ação antimicrobiana de extratos brutos produzidos a partir de plantas cultivadas de forma padronizada para produção de fitoterápicos pelo Laboratório de Fitoterapia da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA).

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico

As plantas utilizadas no estudo foram obtidas na horta medicinal do Laboratório de Fitoterapia da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), onde as condições de

cultivo são controladas e padronizadas. As espécies dispostas em duas fileiras, com 20cm de espaçamento entre elas são cultivadas em canteiros medindo, aproximadamente, 1m de largura por 6m de comprimento e 20cm de altura recebendo luz solar pela manhã; o substrato utilizado para o cultivo é constituído por uma mistura de composto orgânico, húmus de minhoca e barro de jardim (2:1:1) e mensalmente é acrescentado 25kg de composto orgânico em cada canteiro; a irrigação é feita por aspersão duas vezes ao dia (7h às 7h e 30min e 16h 30min às 17h), exceto em períodos chuvosos; a limpeza dos canteiros é feita a cada sete dias por catação manual.

As coletas do material botânico foram realizadas de novembro a dezembro de 2004. A confirmação da identificação botânica foi realizada pela Dra. Rita de Cássia A. Pereira curadora do Herbário Dárdano de Andrade Lima (IPA), onde um exemplar da espécie foi depositado sob o nº 61004.

Preparação dos extratos

Extratos hexânico, clorofórmico, acetônico, etanólico, metanólico e aquoso de raiz, caule e folhas de *L. alba* foram preparados segundo Zelnik et al. (1977). A extração foi feita por maceração em repouso (oito dias) e agitação (4h a 200rpm) para os extratos aquosos. Em ambos os casos a temperatura de extração esteve entre 28-30°C e os extratos foram protegidos da luz. Os extratos foram evaporados a secura e o extrato aquoso foi liofilizado.

Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi verificada *in vitro*, pelo método de difusão em disco de papel (Bauer et al., 1966). Os extratos foram testados frente aos seguintes microrganismos que pertencem a coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco: *Staphylococcus aureus* UFPEDA 01; *Bacillus subtilis* UFPEDA 16; *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138; *Micrococcus luteus* UFPEDA 06; *Escherichia coli* UFPEDA 224; *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 39; *Serratia marcescens*

UFPEDA 398; *Mycobacterium smegmatis* UFPEDA 71; *Monilia sitophila* UFPEDA 2083; *Candida albicans* UFPEDA 1007. Os microrganismos teste foram padronizados pela turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland em solução fisiológica (Barry, 1986; Koneman, 1997), correspondente a uma concentração de aproximadamente 10^7 UFC/mL para leveduras e fungos e 10^8 UFC/mL para bactérias.

Sobre o meio inoculado, foram colocados discos de papel xarope estéreis, de 6mm de diâmetro, embebidos com 10µL da solução do extrato a 200.000µg/mL. Após a colocação dos discos, as placas foram incubadas durante 24h e 48h à temperatura de 30°C e 37°C.

Todos os extratos brutos de *L. alba* foram testados frente às bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, álcool-ácido resistente, levedura e fungo filamentoso. Os extratos que apresentaram boa atividade antimicrobiana foram retestados em triplicata e os diâmetros dos halos foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão dos resultados obtidos nas três repetições. Halos iguais e superiores a 10mm foram considerados significativos de atividade antibiótica (Awadh Ali et al., 2001; Bakshu et al., 2001; Khan et al., 2001 e Chowdhury et al., 2002).

Os antibióticos Kanamicina e Cetoconazol foram utilizados no testes como padrões, nas concentrações de 30µg/disco e 300µg/disco, respectivamente.

A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada, para os extratos que exibiram melhores atividades antibióticas, pelo método de diluições seriada em meio sólido (Carvalho et al. 2002). Alíquotas de diferentes volumes (1,0, 0,5, 0,25, 0,125, 0,06 e 0,03mL) de uma solução a 20.000µg/mL foram colocadas em placa de Petri e homogeneizadas com 10mL do meio de cultura apropriado. Os microrganismos teste foram semeados, em estrias, sobre a superfície do meio e as placas foram incubadas à 37°C e 30°C por 24h e 48h. Valores de CMI iguais ou superiores a 1000µg/mL foram considerados inativos frente aos microrganismos testes (Holetz et al. 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extratos hexânicos, etanólicos e metanólicos das folhas inibiram o crescimento de *M. luteus*; extratos clorofórmico, acetônico e etanólico da raiz de *L. alba* foram ativos frente a *S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *M. sitophila* e *C. albicans*. Nenhum extrato mostrou atividade frente a *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. marcescens* (Tabelas 1 e 2).

A atividade antimicrobiana de *L. alba*, principalmente frente as bactérias Gram-positivas verificada no presente estudo, já havia sido constatada para o óleo essencial da espécie (Alea et al., 1997), para os extratos etanólicos das folhas e soluções extrativas hidroalcoólicas a 80% frente a *S. aureus* (Cáceres et al., 1991; Soares, 2001).

As atividades antifúngicas dos extratos clorofórmico e acetônico da raiz verificadas em nossos estudos, confirmam os estudos de Santos (1996) e Oliveira e Rao et al. (2000), que comprovaram a ação antifúngica para extratos brutos das folhas de *L. alba* e para seus óleos essenciais.

A avaliação da concentração inibitória mínima dos extratos das folhas e raízes de *L. alba*, mostraram concentrações inibitórias entre 31,2 a 1000µg/mL para *S. aureus* e *B. subtilis* (Tabela 3), diferindo dos resultados mencionados por Holetz et al. (2002) e Pessini et al. (2003), os quais encontraram valores de CMI para extratos hidroalcoólicos das folhas e das partes aéreas de *L. alba* superiores 1000µg/mL frente a estes microrganismos.

A atividade antimicrobiana observada para os extratos das raízes e das folhas de *L. alba* incentivam novas pesquisas com substâncias isoladas com o intuito de estabelecer o constituinte ou os constituintes químicos responsáveis por tal atividade.

REFERÊNCIAS

- Alea JA, Luis AG, Pérez AR, Jorge MR, Baluja R 1997. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. *Revista Cubana de Farmácia* 30: 29-35.
- Awadh Ali NA, Julich WD, Kusnick C, Lindequist U 2001. Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology* 74: 173 – 179.
- Bakshu LMD, Ram AJ, Raju RRV 2001. Antimicrobial activity of *Securinega leucopyrus*. *Fitoterapia* 72: 930 - 933.
- Barbosa FG 2003. *Contribuição ao conhecimento químico de três quimiotipos de Lippia alba (Mill.) N. E. Brown, cultivados no horto de plantas medicinais da UFC*. 280p. Tese de Doutorado em Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará.
- Barry AL 1986. Procedure for testing antimicrobial agents in agar media: theoretical considerations. In: Lorian V (ed) *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Baltimore: Williams & Wilkins. p.13.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turk M 1966. Antibiotic susceptibility testing by the standardized single disk method. *Am. J. Clin Pathol* 45: 493 - 496.
- Caceres A, Alvarez AV, Ovando AEO, Samayoa BE 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. *Journal of Ethnopharmacology* 31: 193-208.
- Camargo RCR 2001. *Biologia Floral da Lippia alba (Verbenaceae), atividade antibacteriana e caracterização de amostras de méis de Apis mellifera L.* Botucatu, 99p. Tese de Doutorado

em Zootecnia – Nutrição e produção animal, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Carvalho AA, Sampaio MCC, Sampaio FC, Melo AFM, Sena KXFR, Chiappeta AA, Higino JS 2002. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroalcoólico de *Psidium guajava* L. sobre bactérias Gram-negativas. *Acta Farmacêutica Bonaerense* 21: 255-258.

Chowdhury D, Sayeed A, Islam A, Bhuiyan MSA, Khan GRMAM 2002. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Aerva lanata*. *Fitoterapia* 73: 92-94.

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

Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C 2005. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 305-311.

Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 1027-1031.

Julião LS, Tavares ES, Lage CLS, Leitão SG 2003. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. (erva cidreira). *Rev Bras Farmacogn* 13: 36 –38.

Khan MR, Kihara M, Omoloso AD 2001. Antimicrobial activity of *Symplocos cochinchensis*. *Fitoterapia* 72: 825 – 828.

Koneman EW 1997. *Diagnóstico microbiológico*. México: J. B. Lippincott Co.

Oliveira AC 2000. *Atividade de óleos essenciais e exsudatos de plantas sobre espécies fúngicas isoladas de frutas in natura*. João Pessoa, 86p. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia dos alimentos - Universidade Federal da Paraíba.

Pessini GL 2003. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. *Rev Bras Farmacogn* 13: 21-24.

Rao GP, Singh M, Singh P, Catalan C, Kapoor IPS, Singh OP, Singh G 2000. Studies on chemical constituents and antifungal activity of leaf oil of *Lippia alba* (Mill). *Indian J Chem Technol* 7: 332-335.

Santos MMFB 1996. *Efeito de extratos de duas formas de Lippia alba sobre o fungo Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) isolado de Citrus sp.* São Paulo, 105p. Dissertação de Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de plantas – Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Universidade de São Paulo.

Soares L 2001. *Estudo tecnológico, fitoquímico e biológico de Lippia alba (Miller) N. E. Brown ex Britt. & Wils. (falsa melissa) Vernbenaceae*. 112p. Dissertação de Mestrado em Farmácia - Universidade Federal de Santa Catarina.

Zelnik RD, Lavie EC, Levy AHJ, Wang Paul IC 1977. Barbatusin and cyclobutatusin, two novel diterpenoides from *Coleus barbatus* Benth. *Tetrahedron* 33: 1457-1467.

Tabela 1: Atividade antimicrobiana de extratos de brutos das folha de *Lippia alba* (Mill.) N.

E. Brown produzidos a partir de plantas secas (2.000µg/disco), halos (mm).

Microrganismos	Extratos de planta seca (2.000µg/disco)			Padrões	
	FH	FE	FM	Kanamicina (30µg/disco)	Cetoconazol (300µg/disco)
	Halos (mm)			Halos (mm)	
<i>S. aureus</i>	12,0±0,0	10,3±1,1	11,3±2,1	28	-
<i>M. luteus</i>	20,7±0,6	24,0±1,0	25,0±0,0	34	-
<i>B. subtilis</i>	14,7±1,1	13,0±1,0	12,3±0,6	29	-
<i>P. aeruginosa</i>	s.a.	s.a.	s.a.	20	-
<i>M. smegmatis</i>	9,0±1,0	13,0±1,0	13,3±1,1	40	-
<i>E. faecalis</i>	s.a.	s.a.	s.a.	13	-
<i>E. coli</i>	s.a.	s.a.	s.a.	15	-
<i>S. marcescens</i>	s.a.	s.a.	s.a.	15	-
<i>C. albicans</i>	s.a.	s.a.	s.a.	-	24
<i>M. sitophila</i>	s.a.	s.a.	s.a.	-	22

FH: extrato hexânico da folhas; FE: extrato etanólico da folha; FM: extrato metanólico da folha. sa - sem atividade.

Tabela 2: Atividade antimicrobiana de extratos de brutos das raízes de *Lippia alba* (Mill.) N.

E. Brown produzidos a partir de plantas secas (2.000µg/disco), halos (mm).

Microrganismos	Extratos de planta seca (2.000µg/disco)			Padrões	
	RC	RA	RE	Kanamicina (30µg/disco)	Cetoconazol (300µg/disco)
	Halos (mm)			Halos (mm)	
<i>S. aureus</i>	24,3±3,0	22,3±2,3	20,3±0,6	28	-
<i>M. luteus</i>	30,0±0,0	27,0±1,7	25,7±2,5	34	-
<i>B. subtilis</i>	23,3±0,6	23,3±0,6	22,0±1,0	29	-
<i>P. aeruginosa</i>	s.a.	s.a.	s.a.	20	-
<i>M. smegmatis</i>	19,3±1,1	13,7±1,5	9,3±1,5	40	-
<i>E. faecalis</i>	s.a.	s.a.	s.a.	13	-
<i>E. coli</i>	s.a.	s.a.	s.a.	15	-
<i>S. marcescens</i>	s.a.	s.a.	s.a.	15	-
<i>C. albicans</i>	20,0±1,0	14,3±0,6	9,7±0,6	-	24
<i>M. sitophila</i>	17,3±1,5	s.a.	s.a.	-	22

RC: extrato clorofórmico da raiz; RA: extrato acetônico da raiz; RE: extrato etanólico da raiz.; sa - sem atividade.

Tabela 3: Valores das concentrações mínimas inibitórias (CMI) em µg/mL para os extratos brutos de raiz e folha de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown frente aos microrganismos testes.

Microrganismos	Extratos de planta seca (µg/mL)					
	FH	FE	FM	RC	RA	RE
<i>S. aureus</i>	n.t.	n.t.	n.t.	500	250	1000
<i>M. luteus</i>	500	62,5	250	31,2	125	125
<i>B. subtilis</i>	n.t.	n.t.	n.t.	31,2	250	250
<i>M. smegmatis</i>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>C. albicans</i>	n.t.	n.t.	n.t.	2000	2000	n.t.
<i>M. sitophila</i>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.

Extratos: FH, FE, FM - Folha hexano, etanol, metanol; RC, RA, RE - Raiz clorofórmio, acetona, etanol. nt - não testado.

7 CONCLUSÕES GERAIS

- Os princípios ativos, com ação antimicrobiana e antiinflamatória, estão presentes, principalmente nos extratos brutos das raízes e folhas de *Lippia alba*;
- Células HeLa não foram sensíveis aos extratos etanólico das folhas e clorofórmico das raízes de *Lippia alba*;
- Os extratos clorofórmico da raiz e etanólico das folhas de *L. alba* não inibiram, em camundongos, o crescimento do Sarcoma 180.

8 ANEXOS

8.1 ANEXO A

Tabela 1 - Rendimento do material botânico de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown

MATERIAL BOTÂNICO	RENDIMENTO							
	Planta Fresca	Planta Seca	Extrato Bruto	EA	EC	EE	EH	EM
Raiz	290g	165g	39,67g	2,69g	2,57g	20,24g	1,76g	12,41g
Caule	1060g	475g	39,85g	3,28g	3,16g	6,86g	3,04g	23,51g
Folha	1225g	85g	15,61g	1,83g	1,79g	3,48g	1,13g	7,38g

EA = Extrato acetônico; EC = Extrato clorofôrmico; EE = Extrato etanólico; EH = hexânico; EM = Extrato metanólico.

Fonte: pesquisa da autora

8.2 ANEXO B

Tabela 2 - Constituintes químicos presentes em extratos brutos das folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown.

PARTE DA PLANTA	EXTRATO	COMPOSIÇÃO QUÍMICA	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
Folhas	Aquoso	Citral	Côrrea, 1992
	Aquoso e hidroalcoólico (quimiotipo linalol)	Flavonóides Fenilpropanóides	Ferreira et al., 2002
	Diclorometano Etanólico	Carvona Citral Linalol	Julião et al., 2003
	Aquoso	Alcalóides Taninos Flavonóides	Gazola et al., 2004

Fonte: pesquisa bibliográfica realizada pela autora

8.3 ANEXO C

Tabela 3 - Constituintes químicos presentes em óleos essenciais da raiz, caule e folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown.

ÓLEOS ESSENCIAIS	COMPOSIÇÃO QUÍMICA	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
Folhas	Neral Geranial α - cubebeno β - cariofileno	Craveiro, 1981
	ρ -cimeno γ -terpineno β -cariofileno Mirceno Geraniol Neral	Gomes et al., 1993
	Citral e β - mirceno Citral e limoneno Carvona e limoneno	Vale et al., 1998
	Geranial Neral Cariofileno Citronelol Geraniol	Martins et al., 2000
	Linalol 1,8-cineol + limoneno Germacreno-D β -cariofileno Germacreno D-4-ol	Mallavarapu et al., 2000
	Linalol Citral 1,4 cineol Nerodiol	Santos-Mendes et al., 2000
	Neral Geranial Óxido de cariofileno Linalol T-cariofileno	Ventrella, 2000

Tabela 3 - Constituintes químicos presentes em óleos essenciais da raiz, caule e folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown

(continua)

ÓLEOS ESSENCIAIS	COMPOSIÇÃO QUÍMICA	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
Folhas	Geranial	Rao et al., 2000
	Mirteno e mirtenal	
	Neral	
	Geraniol	
	2,6-octadien-1-ol	
	3,7-dimetilacetato	
	1-octeno-3-ol	
	6-metil-5-hepteno-2-one	
	Óxido cariofileno	
	β -cariofileno	
	Citronelol	
	Linalol	
	3-pipeno-2-ol	
	β - mirceno	
	Farnesol	
	Espanulenol	
Folhas	Geranial	Martins et al., 2000
	Neral	
	Carifioleno	
	Citronelol	
	Geraniol	
	Flavonóides	
	Alcalóides	
Folhas	Citral	Castro, 2001
	t-cariofileno	
	β - elemeno	
	β - mirceno	
Folhas	Germacreno	Sinhorin et al., 2003
	Citral	
	Compostos carbonílicos	
	n - heptano	
Folhas	n – decano	Tavares et al., 2005
	Geranial	
	Neral	
	Linalol	

Tabela 3 - Constituintes químicos presentes em óleos essenciais da raiz, caule e folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown

(continuação)		
ÓLEOS ESSENCIAIS	COMPOSIÇÃO QUÍMICA	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
Folha e raiz	Citral Lipiol Ácido tânico L-limoneno Geraniol	Melo e Xavier Filho, 2000
	1,8 cineol, limoneno, carvona e sabineno Limoneno, carvona e mirceno Neral, geranial, germacrema-D e β -cariofileno	Zoghbi et al., 1998
Partes aéreas (caule e folhas)	Linalol	Lorenzo et al., 2001
	Carvona Limoneno Biciclosequifelandreno Piperitenona β - bourdoneno	Stashenko et al., 2004
Planta inteira (raiz, caule e folhas)	Neral e geranial Carvona	Matos et al., 1996
	Mirceno e citral Limoneno e citral Limoneno e carvona	Matos, 1996
	Limoneno Carvona Piperitemona B-guaiena	Pino e Ortega, 1996

Tabela 3 - Constituintes químicos presentes em óleos essenciais da raiz, caule e folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown

		(continuação)
ÓLEOS ESSENCIAIS	COMPOSIÇÃO QUÍMICA	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
Planta inteira (raiz, caule e folhas)	α-pineno	Alea et al., 1997
	Canfeno	
	Sabineno	
	β-pineno	
	Mirceno	
	p-cimeno	
	Limoneno	
	(E)-β-ocimeno	
	Terpinoleno	
	δ-elemeno	
	α-ilangeno	
	β-bourboneno	
	β-elemeno	
	β-cariofileno	
	α-amorfeno	
	γ-muroleno	
	(E)-β-farneseno	
	β-guaieno	
	Biciclogermacreno	
	γ-cadineno	
	δ-cadineno	
	Candina-1,4-dieno	
	(z)-3-hexenol	
	Linalol	
	Fenchol	
	terpinen-4-ol	
	Borneol	
	Dihidrocarvona	
	Isodihidrocarvona	
	(Z)-piperitol	
	Cuminaldeído	
	Carvona	
	Piperitona	
	Timol	
	Carvacrol	
	Piperitenona	
	Eugenol	
	β-ionona	
	(E)-nerodiol	
	Isolemicina	
	Epicubenol	
	δ-cadinol	
	cariofila-3,8(13)-5β-ol	

Tabela 3 - Constituintes químicos presentes em óleos essenciais da raiz, caule e folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown

(conclusão)		
ÓLEOS ESSENCIAIS	COMPOSIÇÃO QUÍMICA	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
Planta inteira (raiz, caule e folhas)	Linalol	Bhal et al., 2000
	Linalol e 1,8 cineol Cânfora, óxido de cariofileno, β -mirceno, transcariofileno, linalol, canfeno e p-cimeno Citral (geranial e neral) D-limoneno, germacreno-D e carvona	Mendes, 2001
	Limoneno Piperitone	Senatore e Rigano, 2001
	Neral Geranial t-cariofileno	Castro et al., 2002

Fonte: pesquisa bibliográfica realizada pela autora

8.4 ANEXO D

Determinação da DL_{50} (KARBER e BEHRENS, 1964)

$DL_{50} = D_2 - \sum (a \cdot b) / n$, onde:

D_2 = dose mínima capaz de matar todos os animais

a = diferença entre duas doses consecutivas

b = média de animais mortos entre doses consecutivas

n = número de camundongos por lote.

Tabela 4 - Determinação da DL₅₀ do extrato etalônico da folha de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown.

Doses (mg/kg)	Diferença entre duas doses consecutivas (a)	Número de animais mortos	Média de mortes entre duas doses (b)
900		6	
	400		5,5
500		5	
	120		3,5
420		2	
	20		1,0
400		0	

Fonte: pesquisa da autora

$$DL_{50} = 900 - \frac{\sum (2200 + 420 + 20)}{6} = 900 - \frac{2640}{6} = 460\text{mg/kg}$$

Tabela 5 - Determinação da DL₅₀ do extrato clorofômico da raiz de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown.

Doses (mg/kg)	Diferença entre duas doses consecutivas (a)	Número de animais mortos	Média de mortes entre duas doses (b)
1428		6	
	228		5
1200		4	
	200		2,5
1000		1	
	100		0,5
900		0	

Fonte: pesquisa da autora

$$DL_{50} = 1428 - \frac{\sum (1140 + 500 + 50)}{6} = 1428 - \frac{1690}{6} = 1146\text{mg/kg}$$

8.5 ANEXO E

Resumos publicados em Congresso

AGUIAR, J. S. et al. Cultivo, propagação e rendimento de extratos brutos de *Lippia alba* (MILL.) N. E. BROWN. In: CONGRESSO NORDESTINO DE ECOLOGIA, 11, 2006, Recife, **Resumos...** 2006. CD-ROM.

AGUIAR, J. S.; NASCIMENTO, S. C; COSTA, M. C. C. D. Teste de toxicidade aguda de extratos brutos de *Lippia alba* (MILL.) N. E. BROWN. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERAPIA, 2; ENCONTRO DA REDE FITOCERRADO, 5, 2005, Uberlândia, **Resumos...**2005. Disponível em: <<http://www.plantasmedicinais.ufu.br/anais.html>>

AGUIAR, J. S. et al. Comercialização e uso popular de *Lippia alba* (MILL.) N. E. BROWN em Mercados Públicos do Recife, Olinda e Jaboatão dos Guararapes , Pernambuco. In: REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 28, Teresina, **Resumos...** 2005. CD-ROM.

8.6 ANEXO F

Artigo publicado

AGUIAR, J. S.; COSTA, M. C. C. D. *Lippia alba* (MILL.) N. E. BROWN (Verbenaceae): levantamento de publicações nas áreas química, agrônômica e farmacológica, no período de 1979 a 2004. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v. 8, n.1, p. 79 - 84, 2005.

COMUNICAÇÃO***Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae): levantamento de publicações nas áreas química, agronômica e farmacológica, no período de 1979 a 2004.****AGUIAR, J.S.; COSTA, M.C.C.D.****Departamento de Biologia, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, 526, Boa Vista, Recife, PE, Brasil. CEP 50.050-900 Tel.:(081) 3216-4181; *e-mail: mcarmoc@hotmail.com*

RESUMO: Espécie amplamente distribuída em todo o território brasileiro, *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown é conhecida popularmente como erva cidreira. Na medicina popular é utilizada como analgésica, para dores abdominais, hemorróidas, dor de dente, febrífuga, em resfriados e nas afecções hepáticas. Estudos farmacológicos comprovaram atividades analgésicas, espasmolítica, antibacteriana e a ausência de efeitos tóxicos em animais. Visando contribuir para um maior conhecimento da espécie é apresentada uma revisão de publicações envolvendo estudos químicos, agronômicos e farmacológicos publicados no período de 1979 a 2004.

Palavras-chave: *Lippia alba*, plantas medicinais, farmacologia.

ABSTRACT: *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae): survey of the publications in the chemical, agronomical and pharmacological area, published between 1974 to 2004.

Widely distributed species in all the Brazilian territory, *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown is known popularly as cidreira herb. In the popular medicine it is used as analgesic for abdominal pains, hemorrhoids, toothache, febrifuge, in cooled and the hepatic disease. Pharmacology studies had proven analgesic activities, spasmolytic, antibacterial and the absence of toxic effect in animals. Aiming to contribute for a bigger knowledge of the species a revision involving chemical, agronomic and pharmacology studies published in the period of 1979 the 2004 is presented.

Key words: *Lippia alba*, medicinal plants, pharmacology

A espécie *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown pertence à família Verbenaceae que possui cerca de 175 gêneros e 2800 espécies, difundidas nos trópicos e subtropicais nas regiões temperadas do Hemisfério Sul e poucas espécies no Hemisfério Norte (Barroso, 1991). Trata-se de um arbusto aromático medindo até 2m de altura, com ramos finos, esbranquiçados, arqueados e quebradiços. Folhas opostas, elípticas de largura variável, com bordos serrados e ápice agudo. Flores reunidas em inflorescências capituliformes de eixo curto (Matos, 1998).

O aroma da planta está relacionado aos constituintes predominantes nos óleos essenciais, os quais podem variar qualitativa e quantitativamente, em função de diversos fatores, tais como: estações do ano, época de floração, idade da planta, quantidade de água circulante, resultante da precipitação, fatores geográficos e climáticos (Corrêa, 1992; Matos, 1998). Vulgarmente é conhecida como erva cidreira, chá de

tabuleiro, cidrila, alecrim selvagem, cidreira brava, falsa melissa, carmelitana, salva do Brasil, salva, salva limão, alecrim do campo e salva brava (Lorenzi & Matos, 2002).

Encontrada em toda a América tropical e subtropical é amplamente distribuída em todo o território brasileiro, como planta espontânea em terrenos abandonados, ou cultivada em hortas medicinais.

Amplamente utilizada para dores abdominais como digestivas, é consumida principalmente nas formas de chás produzidos a partir das folhas. Também podem ser usadas na forma de compressas para combater hemorróidas; macerada, para o uso local, contra dor de dente; e em forma de banhos, como febrífuga. A infusão alcoólica friccionada é recomendada para combater resfriados e a raiz é usada no Nordeste como aperiente e no combate às afecções hepáticas. Testes farmacológicos realizados

Recebido para publicação em 02/06/2004
Aceito para publicação em 08/06/2005

a partir das folhas comprovaram atividades analgésica, espasmolítica, antibacteriana e peitoral, sem que nenhum efeito tóxico tenha sido verificado em animais tratados com extratos da planta (Corrêa, 1992; Carriconde, 1996).

A comprovação das ações farmacológicas para a espécie, provavelmente motivou estudos químicos visando o isolamento de compostos responsáveis por tais atividades.

Entre os estudos químicos, destacamos aqueles realizados por Corrêa em 1992, o qual referiu que citral isolado do extrato aquoso da folha, como uma substância de ação levemente tranquilizante e antiespasmódica.

Estudos dos óleos essenciais em seis tipos de cidreiras encontradas no Nordeste brasileiro mostraram que o neral e geranial são os constituintes químicos majoritários presentes em três tipos e a carvona foi o constituinte majoritário de outros três. Os estudos levaram a classificação de dois quimiotipos (Matos et al., 1996).

No mesmo ano, Matos (1996 a e b) estudou sete cultivares de cidreiras no Nordeste, quanto aos seus aspectos farmacognóstico, químico e farmacológico. O estudo permitiu separar os sete cultivares em três grupos: um grupo com folhas grandes e ásperas; um grupo com folhas e inflorescências pequenas, com aroma cítrico e adocicado; e um grupo morfológicamente semelhante, mas de odor cítrico não adocicado. Em 1996a, o autor caracterizou os grupos com base no odor, textura e forma das folhas, tamanho e número de flores das inflorescências. Em 1996b, o autor caracterizou os grupos pelos teores dos óleos essenciais: tipo I com teores elevados de mirceno e citral; tipo II com teores elevados de limoneno e citral; tipo III com limoneno e carvona e ausência de citral.

Análise da composição química do óleo essencial de *L. alba* originada de Cuba, revelou a presença de quarenta e dois componentes e os maiores constituintes encontrados foram, limoneno (6,5%), carvona (28,95%), piperitenona (6,35%) e B-guaieno (11,53%) (Pino & Ortega, 1996).

Análise da composição do óleo essencial de *L. alba*, feita por Alea et al. em 1997, levou a identificação de 43 compostos dos quais 20 foram referidos pela primeira vez. Os autores encontraram um alto conteúdo de carvona, o que fez supor a existência de um novo quimiotipo. O fracionamento por cromatografia de coluna indicou que o óleo essencial é constituído por 20,7% de hidrocarbonos e 79,3% de compostos oxigenados.

Estudos dos óleos essenciais das partes aéreas de representantes de *L. alba* coletados em três municípios do Pará, permitiram a divisão destes em três grupos segundo seus componentes: grupo A, caracterizado por 1,8 cineol (34,9%), limoneno

(18,4%), carvona (31,8%) e sabineno (8,2%); grupo B, caracterizado por limoneno (32,1%), carvona (31,8%) e mirceno (11%); e grupo C, caracterizado por neral (13,7%), geranial (22,5%), germacreno-D (25,4%) e α -cariofileno (10,2%) (Zoghbi et al., 1998).

Análise da composição do óleo essencial de *L. alba* realizada por Bahl et al. em 2000, para plantas cultivadas na Índia, mostrou que nessas plantas o maior constituinte do óleo essencial (65%) foi o linalol.

O linalol também foi referido por Mallavarapu et al. (2000), como o componente majoritário do óleo essencial das folhas de *L. alba*, entre os 38 componentes identificados no estudo. Além do linalol (69,3%), foram identificados os seguintes componentes: 1,8-cineol + limoneno (4,6%), germacreno-D (4,2%), α - cariofileno (3,6%) e germacreno D-4-ol (2,7%). Os autores referiam que sendo o linalol presente em grande concentração, as folhas da planta podem ser consideradas como uma boa fonte de monoterpene alcoólico com valor aromático para perfumes e sabores de alimentos.

Nem sempre o linalol é referido como o componente majoritário do óleo essencial das folhas de *L. alba*. Rao et al. em 2000, identificaram 50 componentes correspondentes a cerca de 90% do óleo total da espécie e referiram como componente majoritário o geranial (15,57%), seguido por uma mistura do mirteno e mirtenal (9,89%), neral (9,44%), geraniol (7,36%), 2,6-octadien-1-ol, 3,7-dimetil acetato (6,87%), 1-octeno-3-ol (4,66%), 6-metil-5-hepteno-2-one (4,60%), óxido de cariofileno (4,52%), b-cariofileno (3,09%), citronelol (2,63%), linalol (2,20%), 3-pipeno-2-ol (2,19%), beta mirceno (1,49%), farnesol (1,35%) e espatuleno.

Em 2001, Lorenzo et al. analisando a composição do óleo essencial das partes aéreas de *L. alba*, identificaram 27 componentes correspondendo a 93% do total do óleo que foi estudado e referindo o linalol como componente majoritário (55%).

Estudos fitoquímicos realizados por Mendes em 2001, para plantas de *L. alba*, coletadas em oito diferentes locais, permitiu classificar segundo o local de coleta: formas 1 e 4 - Mato Grosso do Sul, forma 2 - Rio Grande do Sul, formas 3, 5 e 6 - Acre, forma 7 - Paraná e forma 8 - Goiás. A análise dos componentes principais permitiu o agrupamento das formas em quatro grupos distintos: nas formas de 1 e 7 foram encontrados o linalol e 1,8 cineol; na forma 2, a cânfora, o óxido de cariofileno, o B-mirceno, o transcariofileno, o linalol, o canfeno e o p-cimeno; nas formas 4, 6, e 8, o citral; e nas formas 3 e 5, o D-limoneno, germacreno-D e a carvona.

Para *L. alba* coletada na Guatemala foram diagnosticadas altas quantidades de limoneno (43,6%) e piperitone (30,6%) no óleo essencial obtido a partir de plantas secas (Senatore & Rigano, 2001).

Quando Stashenko et al. em 2004, fizeram uma comparação de diferentes métodos de extração, hidrodestilação (HD), extração por destilação simultânea (EDS), hidrodestilação assistida por microondas (HDAM) e extração fluída supercrítica (EFS), das folhas e caules frescos de *L. alba* cultivada na Colômbia, avaliando a atividade antioxidante *in vitro* dos óleos essenciais obtidos pela hidrodestilação, verificaram que a carvona (40-57%) foi o componente mais abundante em SFE e HDAM, seguido de limoneno (24-37%) em EFS e EDS, biciclosquifelandreno (5-22%) em HDAM e EFS, piperotenona (1-2%) em EDS e HDAM e beta-borboneno (0,6-1,5%) em HDAM e EFS. O efeito antioxidante protetor dos óleos essenciais de *L. alba*, foram expressos pelas diferenças nas concentrações do ácido linoléico (determinado pelo seu éster metil), na presença e ausência de antioxidante. Os resultados mostraram o efeito protetor antioxidante do óleo essencial da espécie comparado à ação oxidante exibida pela vitamina E e pelo 2-(terc-butil)-4-metoxifenol (BHA), ambos usados como aditivos naturais e sintéticos.

Alguns estudos sobre a composição química da *L. alba*, relacionaram a composição dos óleos essenciais com aspectos agrônômicos, tais como, cultivo das plantas a sombra ou ao sol, época de colheita e avaliação do rendimento do óleo essencial em diferentes épocas do ano. Entre as publicações envolvendo aspectos agrônômicos destacamos:

A produção de óleo essencial pelas folhas de *L. alba*, cultivada em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita, foram analisadas por Ventrela em 2000. O estudo constatou uma melhor adaptação da planta às condições de alta intensidade luminosa. Os compostos químicos mais abundantes encontrados no óleo foram: neral, geranial, óxido de cariofileno, linalol e t-cariofileno cujas presenças apresentaram alta correlação com os níveis de sombreamento e épocas de colheita.

Estudos feitos para determinar a melhor época de colheita para a produção de biomassa, rendimento e a composição química dos óleos essenciais foram feitos por Castro, em 2001. Os resultados mostraram que uma maior produção de biomassa foliar e rendimento de óleos essenciais ocorreram na primavera e no verão. Identificaram os tricomas secretores dos óleos essenciais utilizando microscopia de luz (ML) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) e que a área e o diâmetro dos tricomas secretores variavam com a época de colheita. Os constituintes químicos majoritários dos óleos essenciais das folhas colhidas em todas as estações do ano foram o citral, t-cariofileno, β -elemeno, β -mirceno e germacreno. Com relação à colheita houve maior produção de biomassa foliar e de rendimento de óleo essencial na porção apical dos ramos,

seguido pela parte mediana e basal. As temperaturas de secagem menores ou iguais a 40°C proporcionaram maiores rendimentos dos óleos essenciais. Entretanto, resultados da análise fitoquímica, tanto na massa fresca como na seca, mostraram as mesmas porcentagens dos constituintes químicos do óleo essencial e os constituintes majoritários identificados foram: citral, mirceno, β -cariofileno e β -elemeno.

A micropropagação "in vitro" de *L. alba* estudada por Grupta et al. em 2001, permitiu aos autores verificarem que a morfologia e a composição química dos óleos essenciais das plantas micropropagadas, eram idênticas aquelas das plantas propagadas vegetativamente.

Dando continuidade aos estudos sobre a produção de biomassa, rendimento e composição química do óleo essencial de *L. alba*, em diferentes épocas do ano e em diferentes partes da planta (apical, mediana e basal), Castro et al., em 2002, observaram que as partes apical e mediana representaram cerca de 80% da massa das folhas frescas. O rendimento da biomassa foliar foi aproximadamente de 5ton/ha nas quatro estações do ano. Os rendimentos médios dos óleos essenciais nas três partes da planta foram 0,15%, 0,47%, 0,46%, 0,55% no outono, inverno, verão e primavera de 1998 e 0,61% para o verão de 1999. Os óleos essenciais mostraram uma semelhança na composição química em relação com a sazonalidade, sendo os componentes majoritários neral, geranial e t-cariofileno.

Durante o período de 1997 a 2003, foram publicados alguns trabalhos comprovando ações farmacológicas de *L. alba*.

Mistura dos óleos essenciais obtidos das folhas e das flores, com cremes biológicos, feita por Elder et al. em 1997, comprovaram que tal mistura era excelente para o tratamento de peles envelhecidas e secas, contribuindo para a coesão da célula da pele e promovendo a formação de uma barreira que regula a perda de umidade transepidérmica.

A ação calmante e espasmolítica suaves observadas para extratos das folhas, foram atribuídas a presença do citral e a atividade analgésica do mirceno (Matos, 1998).

Os efeitos analgésico e antiinflamatório de óleos essenciais das folhas de dois quimiotipos de *L. alba*, foram estudados por Viana et al. em 1998, em camundongos, onde contrações foram induzidas pela carragenina ou pelo dextran. Os resultados mostraram inibição dose dependente da contração com as doses de 0,5 e 1mg Kg⁻¹ i.p. e 1 e 2mg Kg⁻¹ p.o., nos quimiotipos I e II, respectivamente. Um efeito similar, porém menos intenso, foi detectado no teste com formalina, onde os dois quimiotipos inibiram predominantemente a segunda fase da resposta e apenas o efeito do óleo essencial do quimiotipo I foi

revertido pelo antagonista opióide, naxalone. Um efeito antiendematogênico significativo foi visto para o quimiotipo I no modelo de edema induzido pela carragenina ou pelo dextran. Os óleos essenciais, dos dois tipos de *L. alba*, são quimicamente distintos, com o quimiotipo I exibindo alto conteúdo de citral e o quimiotipo II apresentando alto conteúdo de carvona e nenhum citral, justificando as diferenças observadas nas ações farmacológicas.

No ano seguinte, Vale (1999), fez estudos comparativos dos óleos essenciais de três quimiotipos de *L. alba*, os quais foram definidos segundo a predominância de monoterpenos em seus óleos essenciais: Tipo I - com citral e mircenol; tipo II - com citral e limoneno e tipo III - com carvona e limoneno. Observou que os óleos essenciais dos tipos II e III eram mais tóxicos que os do tipo I. Concluiu que os óleos essenciais apresentaram efeitos analgésico, ansiolítico, depressor central, relaxante muscular e diminuidores da temperatura retal. A ação anticonvulsivante, especificamente no modelo induzido com pentilenotetrazol, e o efeito na potencialização do diazepam, sugerem o envolvimento do sistema GABAérgico. Dentre os componentes químicos dos óleos essenciais, o citral, mircenol e limoneno parecem atuar de maneira sinérgica, sendo responsáveis pelos principais efeitos desses óleos.

Em 2000, Zétola utilizou solução extrativa de *L. alba* obtida por percolação com etanol 40%, 60% e 80% (v/v), utilizando uma relação droga: solvente 1:10 (m/v). Após concentradas e diluídas a 20mg/mL em resíduo seco, as soluções extrativas foram testadas em camundongos suíços quanto às ações sedativa e anticonvulsivante. A solução de 80% de etanol foi a que apresentou mais efeitos significativos de sedação e relaxamento muscular.

O efeito anticonvulsivante dos óleos essenciais de três quimiotipos de *L. alba* foi estudado por Barros et al. em 2000, os quais verificaram que a associação dos óleos essenciais com o diazepam promoveu um efeito significativamente potencializador, sendo o citral, o β -mircenol e limoneno, os prováveis componentes ativos dos óleos essenciais.

Atividade antiulcerogênica de *L. alba* estudada por Pascual et al. em 2001, mostrou que tal atividade apresentada pela infusão das folhas, não modificou o pH gástrico e a acidez total em ratos machos Wistar.

Estudos tecnológicos, fitoquímico e biológico de *L. alba*, realizados por Soares em 2001, mostraram que soluções extrativas hidroalcolólicas a 70, 80 e 90% obtidas por maceração (SEM) e percolação (SEP), apresentam uma relação inversa entre o teor de resíduo seco (RS) e o teor de flavonóides totais (FT). Os flavonóides totais para as soluções extrativas hidroalcolólicas a 90% foram os mais altos, as quais foram testadas frente a ação

anticonvulsivante nos modelos de convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ) e eletrochoque máximo (ELM). Para os estudos fitoquímicos resultados promissores foram obtidos na análise da atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*. O modelo de convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ) foi considerado o método mais adequado para a avaliação da atividade anticonvulsivante de preparações extrativas a partir de folhas de *L. alba* e suas frações.

Ações do citral, mircenol e limoneno (constituintes do óleo essencial de um quimiotipo de *L. alba*) sobre o sistema nervoso central, avaliadas por Vale et al. em 2002, mostraram que todos estes componentes apresentaram efeitos sedativo e relaxante motor. Em altas doses, produziram uma potencialização do sono induzido pelo pentobarbital em camundongos, o que foi mais intenso na presença de citral. Nenhum dos componentes mostrou efeito ansiolítico.

Avaliação da atividade anticolinesterase de componentes extraídos de algumas plantas entre as quais representantes do gênero *Lippia* (*Lippia alba* e *Lippia sidoides*) para o tratamento da doença de Alzheimer feitas por Trevisan & Macedo em 2003, mostraram que extratos metanólico e etanólico das folhas de *L. sidoides* inibiram 60% e 77% respectivamente, a enzima acetilcolinesterase. Esses percentuais de inibição, segundo os autores, são indicativos para um aprofundamento dos estudos através do fracionamento dos extratos. Já os extratos hexânico e etanólico das folhas de *L. alba* não apresentaram percentuais de inibição.

Ações antimicrobianas e citotóxica foram avaliadas para extratos de *L. alba*, por alguns pesquisadores como Abraham et al. (1979), que testaram a ação dos extratos aquoso, alcoólico e acetônico, frente a *Neurospora crassa*. Os resultados mostraram efeitos citostáticos indicando uma provável relação antitumoral.

Screening de 68 plantas que são utilizadas na Guatemala no tratamento de doenças respiratórias, foram realizados por Cáceres et al. em 1991. Três bactérias Gram-positivas que causam infecções respiratórias (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae*) foram utilizadas nos testes para verificação da atividade antimicrobiana das plantas selecionadas para o estudo. Entre as plantas originárias da América com grande atividade antibacteriana destacaram-se duas espécies do gênero *Lippia* (*Lippia alba* e *Lippia dulcis*) entre outras plantas de outros gêneros. *L. alba* inibiu principalmente *S. aureus* e *S. pneumoniae* e moderadamente *S. pyogenes* enquanto que *L. dulcis* inibiu mais efetivamente *S. pneumoniae* e *S. aureus* e não inibiu *S. pyogenes*.

Atividade antimicrobiana do óleo essencial

de *L. alba* extraído de toda a planta, sobre bactérias de interesse clínico foram avaliadas por Alea et al. em 1997. O óleo essencial apresentou atividade antibacteriana principalmente sobre bactérias Gram-positivas com concentração inibitória mínima variando entre 0,3 e 0,63mg mL⁻¹. De todas as bactérias testadas apenas *Pseudomonas aeruginosa* mostrou-se resistente às diferentes concentrações testadas. Todas as demais bactérias Gram positivas foram sensíveis, sendo o *S. aureus* inibido com a menor dose do agente antibacteriano.

A atividade de óleos essenciais e exsudatos de *L. alba* sobre fungos isolados de frutas *in natura* (acerola, laranja, mamão, manga e tomates) visivelmente deterioradas, foram analisados por Oliveira em 2000, que testou os óleos essenciais com atividade antifúngica para aumentar o tempo de vida útil dessas frutas. Os resultados mostraram efeito inibidor sobre *Geotrichum spp.*

Também visando avaliar atividade antifúngica para o óleo essencial das folhas de *L. alba*, Rao et al. em 2000, detectaram vapores do óleo que possuem forte atividade antifúngica contra patógenos da cana-de-açúcar. O óleo mostrou-se altamente efetivo no controle da germinação de telesporos de *Ustilago scitaminea* e conídios de *Colletotrichum falcatum* e *Curvularia lunata* na concentração de 3x10(3) µL/L⁻¹. Também mostrou efeito superior a fungicidas comerciais no controle de fungos patogênicos de plantas.

Atividade antibacteriana do mel produzido por *Apis mellifera* L. a partir do néctar das flores de *L. alba* foi avaliada por Camargo em 2001. O estudo foi realizado através da técnica de diluição da amostra de mel em meio de cultura líquido em concentrações a partir de 5% a 80% (v/v). Semeadura em placas de Mueller-Hinton ágar foi feita, para determinação da concentração bactericida mínima (CBM) das linhagens padrão de *S. aureus* e *Escherichia coli*. Os resultados mostraram que a concentração inibitória mínima (CIM) para *S. aureus* foi de 45% (ação bacteriostática) e 60% o valor para CBM. Para *E. coli* verificou-se que o valor da CMI foi de 35% e de 60% para a ação bactericida.

Screening de plantas usadas na medicina popular brasileira para tratamento de doenças infecciosas realizado por Holetz et al. em 2002, mostrou que extratos hidroalcóolicos das folhas de *L. alba* testados frente a *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, exibiram concentrações inibitórias mínimas maiores que 1.000µg/mL para todos os microrganismos, indicando inatividade de todos os extratos.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABRAHAM, A.M.L. et al. Extractos de plantas con propiedades citostáticas que crecen en Cuba. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v.31, n.2, p.105-11, 1979.
- ALEA, J.A. et al. Composición y propiedades antibacteriana de aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. **Revista Cubana de Farmacia**, v.30, n.1, p.29-35, 1997.
- BAHL, J.R. et al. Composition of linalool rich essential oil from *Lippia alba* grown in Indian plants. **Flavour and Fragrance Journal**, v.15, n.3, p.199-200, 2000.
- BARROS, V.G.S. et al. Anticonvulsant activity of essential oils and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.23, n.11, p.1314-17, 2000.
- BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV, 1991. v.3, 255p.
- CACERES, A. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v.31, p.193-208, 1991.
- CAMARGO, R.C.R. **Biologia floral da Lippia alba (Verbenaceae), atividade antibacteriana e caracterização de amostras de méis de Apis mellifera L.** 2001. 99p. Dissertação (Doutorado em Zootecnia - Nutrição e Produção Animal) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.
- CARRICONDE, C. et al. **Plantas medicinais & plantas alimentícias**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1996. 153p.
- CASTRO, D.M. **Efeito da variação sazonal, colheita selecionada e diferentes temperaturas de secagem sobre a produção de biomassa, rendimento e composição de óleos essenciais das folhas Lippia alba**. 2001. 134p. Dissertação (Doutorado em Agronomia – Horticultura) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.
- CASTRO, D.M. et al. Biomass production and chemical composition of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Ex Britt & Wilson in leaves on different plant parts in different seasons. **Acta Horticulturae**, v.1, n.51, p.569, 2002.
- CORREA, C.B.V. Anatomical and histochemical study of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Ex Britt & Wilson, known as erva-cidreira. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.73, n.3, p.57-64, 1992.
- ELDER, H.V. et al. Cosmetologic uses of essential oil of *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown (Lipia). **Rivista Italiana EPPOS**, p. 712-4, 1997.
- GRUPTA, S.K.; KHANUJA, S.P.S.; KUMAR, S. *In vitro* micropropagation of *Lippia alba*. **Current Science Bangalore**, v.81, n.2, p.206-10, 2001.

- HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memoria Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.7, p.1027-31, 2002.
- LORENZI, H.; MATOS, J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. 512p.
- LORENZO, D. et al. Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown from Uruguay. **Flavour and Fragrance Journal**, v.16, n.5, p.356-9, 2001.
- MALLAVARAPU, G.R. et al. Essential oil of *Lippia alba*, a rich source of linalool. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v.22, n.1B, p.765-7, 2000.
- MATOS, F.J.A. As ervas-cidreira do Nordeste do Brasil – Estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) Parte I – Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.77, n.2, p.65-7, 1996a.
- MATOS, F.J.A. As ervas-cidreira do Nordeste do Brasil – Estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae).- Parte II – Farmacoquímica. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.77, n.4, p.137-41, 1996b.
- MATOS, F.J.A. et al. Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in northeast Brasil. **Journal Essential Oil Research**, v.8, n.6, p.695-8, 1996.
- MATOS, F.J.A. **Farmácias Vivas**. Fortaleza: EUFC, 1998. 220p.
- MENDES, M.M.F.S. **Caracterização morfo-anatômica, fitoquímica e molecular de oito formas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Ex Britt & Wilson**. 2001. 102p. Dissertação (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.
- OLIVEIRA, A.C. **Atividade de óleos essenciais e exsudatos de plantas sobre espécies fúngicas isoladas de frutas in natura**. 2000. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de alimentos)- Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- PASCUAL, M.E. et al. Antitumorogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **II Farmaco**, v.56, p.501-4, 2001.
- PINO, J.A.; ORTEGA, A. Chemical composition of the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown from Cuba. **Journal, Essential Oil Research**, v.8, n.4, p.445-6, 1996.
- RAO, G.P. et al. Studies on chemical constituents and antifungal activity of leaf oil of *Lippia alba* (Mill.) **Indian Journal of Chemical Technology**, v.7, n.6, p.332-5, 2000.
- SENATORE, F.; RIGANO, D. Essential oil of two *Lippia* ssp. (Verbenaceae) growing wild in Guatemala. **Flavour and fragrance Journal**, v.16, n.3, p.169-71, 2001.
- SOARES, L. **Estudo tecnológico, fitoquímico e biológico de *Lippia alba* (Miller) N. E. Br. Ex Britt. & Wills (falsa-melissa) Verbenaceae**. 2001. 122p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.
- STASHENKO, E.E. et al. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. **Journal of Chromatography A**, v.1025, n.1, p.93-103, 2004.
- TREVISAN, M.T.S.; MACEDO, F.V.V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento de doença de Alzheimer. **Química Nova**, v.26, n.3, p.301-4, 2003.
- VALE, T.G. **Estudo farmacológico comparativo de óleos essenciais de quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown**. 1999. 150p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará. Ceará.
- VALE, T.G. et al. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Phytomedicine**, v.9, n.8, p.709-14, 2002.
- 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. 86p. Dissertação (Doutorado em Agronomia – Horticultura) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.
- VIANA, G.S.B. et al. Analgesic and antiinflammatory effects of two chemotypes of *Lippia alba*: a comparative study. **Pharmaceutical Biology**, v.36, n.5, p.347-51, 1998.
- ZÉTOLA, M. **Desenvolvimento de preparações extrativas de *Lippia alba* (Miler) N. E. Brown ex Britt & Wils (falsa-melissa) Verbenaceae**. 2000. 115p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- ZOGHBI, M.D.G.B et al. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Growing wild in the Brazilian Amazon. **Flavour and Fragrance Journal**, v.13, n.1, p.47-8, 1998.