



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE
CURSO BACHARELADO EM FARMÁCIA

JOANA SABRINA ALENCAR PEIXOTO

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE EXTRATO E ÓLEOS ESSENCIAL DA
Lippia alba COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

CUITÉ – PB

2019

JOANA SABRINA ALENCAR PEIXOTO

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE EXTRATO E ÓLEOS ESSENCIAL DA
Lippia alba COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso de Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, *Campus* Cuité-PB, como requisito indispensável para obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Francinalva Dantas de Medeiros

CUITÉ-PB

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE

Responsabilidade Rosana Amâncio Pereira – CRB 15 – 791

P379c Peixoto, Joana Sabrina Alencar.

Caracterização fitoquímica de extrato e óleo essencial da *Lippia alba* com potencial atividade antimicrobiana. / Joana Sabrina Alencar Peixoto. – Cuité: CES, 2019.

45 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2019.

Orientação: Francinalva Dantas de Medeiros.

1.Lippia alba. 2. Fitoquímica. 3. Atividade antimicrobiana. I.
Título.

Biblioteca do CES - UFCG 615.1

CDU

JOANA SABRINA ALENCAR PEIXOTO

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE EXTRATO E ÓLEOS ESSENCIAL DA
Lippia alba COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

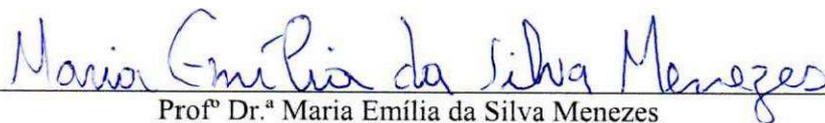
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso de Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, *Campus Cuité-PB*, como requisito indispensável para obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Aprovado em: 27 de novembro de 2019.

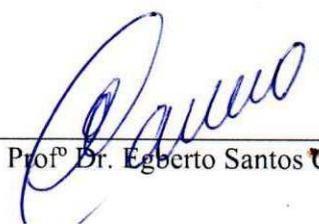
BANCA EXAMINADORA



Prop Dr.^a Francinalva Dantas de Medeiros
(Orientadora)



Prof^o Dr.^a Maria Emília da Silva Menezes



Prof^o Dr. Egberto Santos Carmo

Agradeço a Deus por mais essa realização. Dedico esse trabalho a meu pai Januncio, minha mãe Alexandra e a minha avó Maria, por nunca medirem esforços para a realização do nosso sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser minha âncora nesses cinco anos árduos de graduação, por permitir a realização dos meus sonhos, por ser sempre minha força para nunca desistir e seguir em frente, mesmo diante das dificuldades, distância de casa e a saudade que era constante, graças a Ele, estou prestes a concluir mais um sonho.

A minha família, em especial ao meu pai Januncio Lourenço Peixoto que graças a sua total dedicação para que nunca faltasse nada nessa longa jornada, por todas as palavras de apoio, por ser um pai do qual sempre me espelhei e por sempre fazer de tudo por mim. A minha mãe Alexandra Alencar Fernandes Peixoto, que foi meu alicerce, nos momentos de dificuldades, com suas sábias palavras confortantes contribuiu para que eu me tornasse uma pessoa mais forte para vencer os obstáculos, e por todas vezes que esteve comigo, me incentivando a ter uma graduação, para que eu me tornasse uma mulher forte e independente, a senhora sem dúvidas é a minha maior inspiração. A meu irmão Rhyan Bruno Alencar Peixoto, por sempre estar ao meu lado nas dificuldades enfrentadas.

A minha avó Maria do Socorro Alencar, por ser minha segunda mãe e sempre me ajudou em todos os momentos da minha graduação. A meu avô José Alencar Fernandes por mesmo que distante sempre fez de tudo para que minha educação fosse a melhor. A minha avó Judite Ferreira Peixoto (*in memoriam*) que infelizmente não pode estar presente para a realização desse sonho conjunto, mas que deixou inúmeros aprendizados para a minha vida.

A minha tia Eglantina Alencar Fernandes por todo apoio durante minha trajetória, todas as ajudas necessárias, por me ensinar um pouco do seu conhecimento na área de enfermagem, e por minha prima Adrielly Maria Alencar Oliveira, que mesmo na inocência de ser criança foi fundamental para tornar meus dias mais felizes e me dá força nessa caminhada e por ser um presente em nossa família.

Aos meus demais tios e tias, que sempre me incentivaram para a realização do meu sonho, em especial também a minha tia/madrinha Genecelda de Oliveira Penaforte por todo o suporte nos momentos difíceis em Cuité e toda ajuda necessária na minha estadia em Campina Grande.

A professora Francinalva Dantas de Medeiros por ter me aceitado como orientanda, e por sempre ter disponibilidade a me ajudar, mesmo com tantas tarefas acumuladas. Por ter me proporcionado a oportunidade de participar de um projeto de pesquisa, acreditando no meu potencial como também acrescentar no meu futuro profissional, além de ser uma excelente pessoa e me mostrar o nosso futuro de estudante de uma forma diferente. E a todos os professores da UFCG/CES que foram os maiores responsáveis por eu estar concluindo esta

etapa em minha vida, por me proporcionar o conhecimento no processo de formação profissional.

Ao meu amigo Marcus Vinicius Dutra dos Santos, por além de dividir casa, amizades, foi meu companheiro de laboratório e pesquisa, que juntos estamos concluindo essa etapa, com inúmeros aprendizados e com uma bagagem de conhecimentos e também a Ítalo da Silva Batista por dividir essa rotina de laboratório e sempre estar disposto a ajudar e desde o primeiro período ser meu amigo.

Agradecer a Gustavo Queiroga, por nos ajudar a concluir nossa pesquisa, com uma paciência extrema, uma atenção ímpar, se disponibilizar a estar no laboratório aos sábados e domingos nos ajudando, além de desde o começo da sua graduação sempre esteve disposto a me ajudar como amigo e conterrâneo. Como também agradecer a Girlene, Wagner e Fran por toda ajuda para que este trabalho fosse concluído.

Aos meus amigos que construí em Cuité, Letícia Mirelle, Bruna Barbosa, César Augusto, Alisson Lucas, Camila Soares, Maria Medeiros, Marcus Vinicius, Luana Sayuri, Ítalo Batista, Matheus Merson, Maria Thaynara, Karine Maia e Fernando Sousa por serem minha família fora de casa, por sempre me darem apoio nos momentos difíceis e por alegrarem meus dias, em especial as meninas Bruna Barbosa e Letícia Mirelle por serem minhas irmãs que nunca tive, por me fazerem ser uma pessoa melhor e estarem sempre ao meu lado.

Agradecer a Kaltz Victor e Michel Perone por serem amigos que construí em Cuité e profissionais que sempre irei me espelhar.

As minhas amigas da minha cidade natal Uiraúna, Estefany Lorrana, Charlotti Barbosa, Letícia Sousa, Letícia Abrantes e Brenda Sousa por todas as palavras de incentivo e por me tirarem do estresse causado pelas tarefas da faculdade.

Queria agradecer em especial, a Gustavo Nunes Cardoso, que sempre me ajudou para que eu concluísse meu curso com palavras confortantes e me ensinou muito sobre a graduação, como era uma realidade diferente e como eu podia enfrentar os obstáculos, e também como profissional, pois foi com você que eu aprendi a vê a profissão de farmacêutico como um cuidador ao paciente e ter como um exemplo a seguir, além de sempre ter um carinho especial por você.

E agradecer a todos da turma XVI, pois nossa turma sempre foi sinônimo de união e referência, todos os momentos juntos desde de estudos a farras, sempre estando dispostos um a ajudar o outro e caminhar juntos, vocês foram incríveis.

"Se existe magia em lutar além dos limites da resistência, esta é a mágica de arriscar tudo por um sonho que ninguém enxerga, só você".

- Menina de Ouro

RESUMO

A humanidade, desde os primórdios, percebeu que as plantas possuíam poder curativo. Essa cultura foi passada por gerações e aprimorou-se na atualidade, buscando cada vez mais diminuir os danos causados pelos medicamentos convencionais e introduzir alternativas terapêuticas na clínica, capazes de minimizar os efeitos indesejáveis como a resistência bacteriana. A *Lippia alba* planta nativa brasileira, popularmente conhecida como Erva cidreira, apresenta inúmeros benefícios relacionados com a resistência de microrganismos, tanto de seus variados tipos de extratos como também do seu óleo essencial. Diante do exposto, objetivou-se realizar a caracterização fitoquímica e avaliar seu potencial antimicrobiano. Para tanto, foram coletadas amostras da planta e produzido seu extrato hidroalcolico, em que foram realizados testes fitoquímicos como também feita a extração do seu óleo essencial pelo aparato de Clevenger, foram realizados testes microbiológicos a partir da técnica de microdiluição em placas e identificação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), testando em cepas de fungos patogênicos, onde foram cinco espécies do gênero *Candida* e uma de *Cryptococcus neoformans* e assim descobrir a atividade antimicrobiana dessas duas soluções. Os resultados da pesquisa em relação a fitoquímica, detectou-se a presença de alcalóides e taninos, que sugeriam a sua atividade antimicrobiana correlacionado com os resultados obtidos nas análises microbiológicas em que tanto para o extrato como para o óleo foram positivos para *Cryptococcus neoformans*, colaborando assim, para a utilização dessa planta como antimicrobiana. Sendo assim, ressalta-se a importância da caracterização fitoquímica e microbiológica das plantas comumente utilizadas pela medicina tradicional, a fim de garantir seu uso racional.

Palavras-chave: *Lippia alba*; fitoquímica; atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

From the beginning, mankind realized that plants had healing power. This culture has been passed on for generations and has improved today, increasingly seeking to reduce the damage caused by conventional drugs and introduce therapeutic alternatives in the clinic, able to minimize undesirable effects such as bacterial resistance. *Lippia alba* native Brazilian plant, popularly known as Lemon balm, has numerous benefits related to the resistance of microorganisms, both its various types of extracts and its essential oil. Given the above, the objective was to perform the phytochemical characterization and evaluate its antimicrobial potential. For this, samples were collected from the plant and produced its hydroalcoholic extract, in which phytochemical tests were performed as well as extraction of its essential oil by Clevenger apparatus, microbiological tests were performed using the plate microdilution technique and identification of Concentration. Minimal Inhibitory (MIC), testing on pathogenic fungi strains, where were five species of genus *Candida* and one of *Cryptococcus neoformans* and thus discover the antimicrobial activity of these two solutions. The results of the research regarding the phytochemistry detected the presence of alkaloids and tannins, which suggested their antimicrobial activity correlated with the results obtained in the microbiological analyzes in which both the extract and the oil were positive for *Cryptococcus neoformans*. thus, for the use of this plant as antimicrobial. Thus, the importance of phytochemical and microbiological characterization of plants commonly used by traditional medicine is emphasized in order to ensure their rational use.

Keywords: *Lippia alba*; phytochemistry; antimicrobial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: <i>Lippia alba</i> (Erva Cidreira)	19
Figura 2: Molécula de isopreno.....	22
Figura 3: Rota biossintética dos terpenóides.....	22
Figura 4: Rota biossintética dos fenilpropanóides	23
Figura 5: 50g de planta (<i>Lippia alba</i>)	27
Figura 6: Extrato hidroalcolico da <i>Lippia alba</i>	28
Figura 7: Aparato de Clevenger para extração do óleo	29
Figura 8: Resultado da análise visual da <i>Lippia alba</i>	32
Figura 8: Perfil cromatográfico de <i>Lippia alba</i>	34

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Resultado da fitoquímica da <i>Lippia alba</i>	32
Quadro 2 – Determinação da CIM do extrato hidroalcolólico da <i>Lippia alba</i> (Erva Cidreira).....	34
Quadro 3 – Determinação da CIM do óleo essencial da <i>Lippia alba</i> (Erva Cidreira).....	35
Quadro 4 – Determinação da CIM do fármaco controle Anfotericina B.....	35

LISTA DE SIGLAS

μL – Microlitro

3S – 3-hidroxi-3metilgluratil coenzima A

ASD – Ágar Sabouraud Dextrose

C_5H_8 – Isopreno

CES – Centro de Educação e Saúde

CGEN – Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CO_2 – Gás Carbônico

g – Gramas

HCl – Ácido Clorídrico

IPP – Pirofosfato de isopentila

LTDA – Limitada

mL – Miligrama

MS – Ministério da Saúde

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

OMS – Organização Mundial de Saúde

PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

SUS – Sistema Único de Saúde

UFC – Unidade Formadora de Colônias

UFCG – Universidade Federal de Campina Grande

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 Plantas medicinais.....	17
3.2 O uso de plantas medicinais como alternativas terapêuticas	17
3.3 <i>Lippia alba</i> (Erva cidreira)	18
3.4 Caracterização fitoquímica de extratos de plantas.....	20
3.5 Óleos essenciais	21
3.6 Métodos de extração de óleos essenciais	23
3.7 Atividade antimicrobiana da <i>Lippia alba</i>	25
4. METODOLOGIA	27
4.1 Coleta e identificação do material vegetal.....	27
4.2 Preparação do extrato hidroalcolico e testes fitoquímicos.....	27
4.3 Obtenção dos óleos essenciais da <i>Lippia alba</i>	29
4.4 Determinação de resíduo seco	29
4.5 Screening Microbiológico.....	30
4.6 Meio de cultura e inóculo	30
4.7 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÃO	39

1. INTRODUÇÃO

O poder curativo das plantas é tão antigo quanto o aparecimento da espécie humana na terra. Desde cedo as primeiras civilizações perceberam que algumas plantas continham, em suas essências, princípios ativos ao serem experimentados no combate às doenças, e revelaram empiricamente esse poder curativo. Durante muito tempo, o uso de plantas medicinais foi o principal recurso terapêutico utilizado para tratar a saúde das pessoas e de suas famílias. Entretanto, com os avanços ocorridos no meio técnico-científico, sobretudo no âmbito das ciências da saúde, novas maneiras de tratar e curar as doenças foram surgindo, uma dessas maneiras consiste no uso de medicamentos industrializados, gradativamente introduzidos no cotidiano das pessoas, através de campanhas publicitárias que prometia curar as mais diversas doenças. Desde então, o uso de plantas medicinais vem sendo substituído pelos medicamentos convencionais (BADKE et al., 2011).

Porém, a procura por produtos naturais com atividade antimicrobiana tem merecido destaque, principalmente com o advento de cepas multirresistentes, além dos inconvenientes apresentados pelos fármacos de origem sintética, como as reações adversas. Essas alternativas têm despertado o interesse nacional e internacional pelo potencial terapêutico e econômico que representa, o Brasil possui a maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, com uma grande diversidade de solos e climas que favorecem a riqueza e variedade de tipos de vegetação e espécies de flora distribuídas nos diversos ecossistemas.

No Brasil, foi criada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), sendo instituída pela Portaria do Ministério da Saúde (MS) nº 971, de 03 de maio de 2006, e atualizada pela portaria nº 702, de 21 de março de 2018. Esta portaria tem como objetivo ampliar as opções terapêuticas aos usuários do SUS, com garantia de acesso a plantas medicinais, a fitoterápicos e a serviços relacionados à fitoterapia, com segurança, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia e da indústria nacional (BRASIL, 2006)

Consequentemente, acontece um crescente interesse em plantas medicinais como nova visão em relação aos medicamentos convencionais para que haja a diminuição do consumo destes medicamentos, particularmente contra bactérias e fungos, devido ao aumento da resistência de patógenos associados a doenças infecciosas aos antimicrobianos comumente utilizados na prática clínica. Dessa forma, as investigações fitoquímicas e microbiológicas de plantas medicinais são importantes para a obtenção de novos recursos terapêuticos, com garantia de eficácia, qualidade e segurança.

Assim, tem-se como exemplo a espécie *Lippia alba*, popularmente conhecida como erva cidreira, planta de ampla distribuição no ecossistema da América Latina, principalmente no Brasil, cultivada em diferentes regiões, que apresenta diversas propriedades biológicas, com ênfase na atividade antimicrobiana, como uma alternativa de praticidade e eficácia contra cepas resistentes.

Sendo assim, ressalta-se a importância do desenvolvimento de estudos que visem descoberta de alternativas terapêuticas aos tratamentos convencionais da clínica, principalmente aqueles relacionados com ineficácia terapêutica, baixa adesão, resistência microbiana e eventos adversos severos, além da valorização da biodiversidade e de saberes populares, trazendo benefícios para o desenvolvimento da ciência e da sociedade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar a caracterização fitoquímica do extrato da espécie *Lippia alba* inserida no semiárido brasileiro, bem como avaliar o seu potencial antimicrobiano, assim como do seu óleo essencial.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a coleta e identificação botânica da espécie *Lippia alba*;
- obter extrato e o óleo essencial da planta e otimizar as condições do processo;
- realizar caracterização fitoquímica do extrato obtido;
- obter perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico; e,
- realizar *screening* microbiológico do extrato e óleo essencial.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Plantas medicinais

A humanidade convive com uma grande diversidade de espécies vegetais, desenvolvendo maneiras particulares de utilizá-las para distintas finalidades, usando-as como alternativa de sobrevivência. Dentre estas, a partir do conhecimento tradicional, destaca-se o conhecimento sobre a utilização de plantas para fins terapêuticos (OLIVEIRA; BARROS; MOITA NETO, 2010).

Planta medicinal é toda planta que administrada ao homem ou animal, por qualquer via ou forma, exerça alguma ação terapêutica. O tratamento feito com uso de plantas medicinais é denominado de fitoterapia, e os fitoterápicos são os medicamentos produzidos a partir dessas plantas. Sendo assim, a fitoterapia é caracterizada pelo tratamento com o uso de plantas medicinais e suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de princípios ativos isolados, permitindo que o ser humano se reconecte com o ambiente, acessando o poder da natureza para ajudar o organismo a normalizar funções fisiológicas prejudicadas, restaurar a imunidade enfraquecida, promover a desintoxicação, rejuvenescimento, entre outros (FIRMO et al., 2012).

Há uma crescente utilização da fitoterapia pela população brasileira, dois fatores poderiam explicar este aumento. O primeiro seria os avanços ocorridos na área científica, que permitiram o desenvolvimento de fitoterápicos reconhecidamente seguros e eficazes. O segundo é a crescente tendência de busca, pela população, por terapias menos agressivas destinadas ao atendimento primário à saúde (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012).

3.2 O uso de plantas medicinais como alternativas terapêuticas

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% usam plantas medicinais ou preparações destas. Desde então a OMS tem expressado a sua posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário e na atenção básica à saúde (ROSA; CAMÂRA; BÉRIA, 2011).

O efeito terapêutico, atribuído as plantas medicinais, em geral, está relacionado ao efeito sinérgico de seus constituintes químicos. Esse fato é um ponto positivo em relação a utilização frente aos microrganismos, devido a resistência a alguns dos antimicrobianos

convencionais, muitas vezes ocasionado pelo uso irracional dos mesmos (PARACAMPO et al., 2017).

O desenvolvimento de resistência antimicrobiana em bactérias zoonóticas (a exemplo da *Salmonella spp.* e *E. coli*), constitui um risco para a saúde pública, pois podem afetar a eficácia do tratamento. A utilização de agentes antimicrobianos naturais como óleos essenciais de plantas, têm demonstrado ser uma alternativa eficaz no controle de bactérias resistentes a antibióticos, seja na inibição ou modulação das mesmas (RIBEIRO et al., 2012). E também o efeito sinérgico da associação de antibiótico com extratos de plantas contra bactérias resistentes pode levar a novas opções no tratamento de doenças infecciosas, quando o antibiótico não for mais eficaz por si só, durante o tratamento terapêutico (AIYEGORO; OKOH, 2010). Assim, o uso de plantas que possuem atividade farmacológica, associada ou não, seguindo seu uso racional, seja extrato ou óleo essencial, é uma alternativa eficaz e menos danosa apresentada a população, comprovadamente através das investigações científicas de eficácia, qualidade e segurança.

3.3 *Lippia alba*

A *Lippia Alba*, popularmente conhecida como erva cidreira, pertence à família Verbenaceae, a qual consiste em 200 espécies amplamente distribuídas na América do Sul, América Central e África. Devido à ampla utilização tradicional, os nomes populares atribuídos a espécie são numerosos e, estão relacionados ao odor aromático ou propriedades medicinais das plantas. No Brasil, os nomes mais comuns são: erva-cidreira, falsa-melissa, chá-de-tabuleiro, erva cidreira-do-campo, salva-do-Brasil, salva-limão e erva-cidreira-brava, chá-da-febre, erva-cidreira brasileira e alecrim do campo (TAVARES; MOMENTÉ; NASCIMENTO, 2011). É um arbusto aromático (figura 1), 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 (CORTEZ et al., 2015).

Figura 1 – *Lippia alba* (Erva cidreira)



Fonte: Dados da autora, 2019.

Esta espécie possui grande importância medicinal, sendo utilizada na forma de chás, macerada, em compressas, banhos ou extratos alcoólicos (CUNHA et al., 2012). E apresenta propriedades medicinais como, analgésica, febrífuga, anti-inflamatória, antigripal e nas afecções hepáticas. É uma planta bastante utilizada pela ampla variabilidade química de compostos, bem como, os óleos essenciais, sendo estas substâncias responsáveis por suas várias utilizações na medicina popular e na fitoterapia, com propriedades anti-inflamatórias e antissépticas, além de propriedades antibacterianas e antifúngicas, e para distúrbios estomacais, sedativa, e infecções das vias respiratórias (TAVARES; MOMENTÉ; NASCIMENTO, 2011).

O potencial industrial dessa espécie está associado às grandes facilidades agrônomicas que ela apresenta como a rusticidade, a rapidez de colonização pela propagação vegetativa, o vigor, a alogamia (fonte de variabilidade) e, também por vegetar e florescer o ano todo, além de apresentar ampla adaptação para vários ambientes (plasticidade fenotípica). (TAVARES; MOMENTÉ; NASCIMENTO, 2011).

A *Lippia alba* é uma espécie caracterizada por grande diversidade fitoquímica, principalmente do grupo dos terpenos. A diversificação no uso fitoterápico desta espécie está relacionada com a composição química/quimiotipo do óleo essencial, resultante da interação entre as características genéticas da planta e das condições ambientais. Os principais quimiotipos encontrados são citral, citral-mirceno, citral-limoneno, carvonlimoneno e linalol. Nessa espécie existem quimiotipos como o citral-mirceno, citral-limoneno têm sido bastante

utilizadas no Brasil, na forma de chá das folhas frescas, às quais têm sido atribuídas ações calmante, espasmódica, analgésica, sedativa e ansiolítica. O citral, resultante da mistura dos isômeros geranial (citral a) e o neral (citral b) é um dos principais componentes do óleo essencial (JANNUZZI et al., 2011).

3.4 Caracterização fitoquímica de extratos de plantas

Os metabólitos secundários são compostos de estrutura complexa, baixo peso molecular e são originados a partir do metabolismo primário, que possuem como rotas biossintéticas principais as vias do ácido chiquímico e do acetato - malonato. São conhecidos por desempenharem um papel importante na adaptação das plantas aos seus ambientes e por estarem, muitas vezes, presentes em baixas concentrações e possuírem atividades biológicas marcantes (FUMAGALI et al., 2008; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Esses metabólitos podem apresentar diversas ações farmacológicas que incluem atividades anti-inflamatórias (terpenos, esteroides, flavonóides); ação laxativa e expectorante (saponinas); antimicrobianas (taninos, flavonóides, saponinas); analgésica (alcalóides e flavonóides), por exemplo (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

A realização destes testes fitoquímicos é essencial para o controle de qualidade das plantas medicinais, no intuito de proporcionar a segurança e a efetividade. A análise do teor dos principais componentes biologicamente ativos em matérias primas de origem vegetal ou fitoterápicos é essencial para garantir a autenticidade, pureza e integridade das ervas medicinais. Os testes fitoquímicos procuram evidenciar as principais classes de metabólitos através do uso de técnicas colorimétricas, cromatográficas e demais metodologias analíticas que permitam a identificação dos produtos naturais, além de permitir a separação e o isolamento destes, para o conhecimento da composição química, como também para a padronização do material vegetal e produtos relacionados (SOUZA et al., 2017).

O interesse científico e econômico embutido na busca de substâncias ativas a partir de princípios vegetais vem do fato de que a variabilidade e complexidade das moléculas sintetizadas pelas plantas têm, muitas vezes, síntese orgânica difícil e dispendiosa, ou ainda, tamanha é a complexidade da molécula que a rota sintética é desconhecida. Essas moléculas sintetizadas pelas plantas têm sua distribuição restrita na natureza, limitando-se, algumas vezes, a uma espécie ou a espécies relacionadas (GODINHO et al., 2016).

A *Lippia alba* apresenta inúmeras atividades farmacológicas, essas atividades estão correlacionadas com os metabólitos secundários encontrados nesta planta, da extração do seu

óleo essencial observa-se terpenos e flavonoides que estão associados com a atividade antimicrobiana e antifúngica.

3.5 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são metabólitos secundários extraídos de diversas partes de plantas, possuem composição química complexa e garantem aos vegetais vantagens adaptativas no meio em que estão inseridos e sua composição química varia entre as espécies e partes de um mesmo vegetal (MIRANDA et al., 2016). São substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também chamados de óleos etéreos ou essências, devido a algumas de suas características físico-químicas, como volatilidade, solubilidade em solventes orgânicos, e aroma intenso, mas muitas vezes agradável. Essa sua volatilidade, que o difere assim, dos óleos fixos, que são misturas de substâncias lipídicas obtidas normalmente de sementes, representando sua principal característica.

No óleo essencial da *Lippia alba* foi observada a presença de carvona e geranial, que são terpenóides, carvacrol, que é um monoterpenóide e timol, um terpeno, todos com propriedades odoríferas diferentes. Além de tais compostos voláteis, outras substâncias tais como alcalóides, taninos, flavonóides, iridóides e naftoquinonas podem ser encontrados também nos seus extratos (OLIVEIRA et al., 2018).

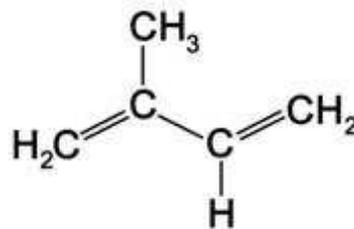
Os óleos essenciais são amplamente utilizados por suas fragrâncias e propriedades medicinais, dentre essas propriedades medicinais apresentam atividades antimicrobiana, antifúngica, acaricida, anti-inflamatória, antioxidante, anticonvulsiva, entre outras (SILVEIRA et al., 2018). A composição e a atividade de um óleo essencial podem ser modificadas por vários aspectos, desde o modo de extração, a fatores próprios da planta e do ambiente em que ela está inserida, como horário de colheita da planta, ou seja, a sazonalidade, utilização de que parte da planta, dentre outros (SILVA et al., 2011).

Os constituintes químicos dos óleos essenciais em geral podem ser divididos em duas classes: a classe terpênica, que pode ser identificada pela via do Acetil/CoA/ácido mevalônico e a classe aromática, constituindo os fenilpropanóides pela da via do ácido chiquímico.

Sendo assim, a maioria dos óleos essenciais formados majoritariamente por terpenos ou seus derivados. Tais substâncias constituem-se como um extenso grupo de moléculas orgânicas produzidas como metabólitos secundários para evitar injúrias promovidas por agentes externos e dessa forma, os terpenos apresentarem reconhecida atividade

antimicrobiana. Apesar de existir diferenças estruturais entre si, todos os terpenos ou terpenoides são basicamente estruturados em blocos de cinco carbonos – unidades de isopreno ($C^5 H^8$) (Figura 2) (FELIPE; BICAS, 2017). Essa estrutura denominada isopreno é formado após a conversão do ácido mevalônico em pirofosfato de isopentila (IPP) através da fosforilação seguida de uma descarboxilação (PINTO, 2012). A rota da biossíntese dos terpenos (Figura 3) a partir do ácido mevalônico inicia-se pela condensação aldólica de três unidades de acetil coenzima A, formando o composto (3S) 3-hidroxi 3-metilgluratil coenzima A, que pela sua redução irreversível forma o ácido mevalônico e seu isômero, precursores dos terpenos (PINTO, 2012).

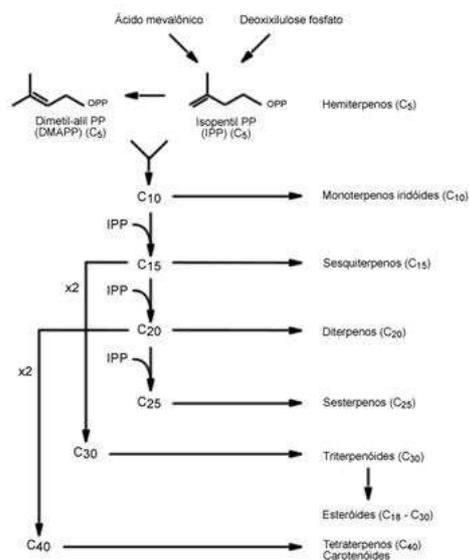
Figura 2 – Molécula de isopreno



Fonte: Forgaça, 2019.

Os terpenos encontrados com maior frequência nos óleos essenciais são os monoterpenos e sesquiterpenos, mas também se encontra os diterpenos, sendo constituintes minoritários dos óleos essenciais.

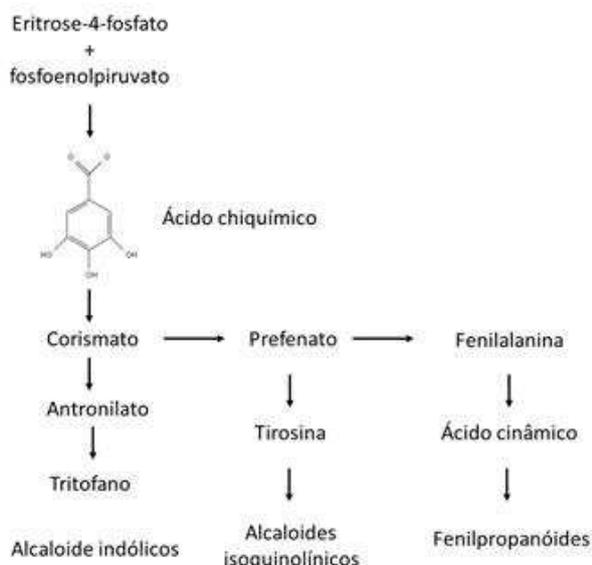
Figura 3 – Rota biosintética dos terpenos



Fonte: próprio autor.

Os fenilpropanóides se formam a partir do ácido chiquímico, que forma as unidades básicas dos ácidos cinâmico e *p*-cumárico. O ácido 3-dehidrochiquímico formará o ácido chiquímico que após diversas reações sintetiza os aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano). A fenilalanina, quando desaminada pela ação da PAL (fenilalanina amônia liase), origina o ácido cinâmico, o primeiro fenilpropanoide (C6-C3) formado. Os fenilpropanóides subsequentes podem sofrer diversas alterações mediadas por enzimas que levarão a formação de outras classes de substâncias fenólicas (REZENDE et al., 2016). A (Figura 4) mostra a rota de biossíntese dos fenilpropanóides, uns dos constituintes dos óleos essenciais.

Figura 4 – Rota biosintética dos fenilpropanóides



Fonte: próprio autor

3.6 Métodos de extração de óleos essenciais

Os óleos essenciais podem ser extraídos através de inúmeras técnicas. Os métodos mais utilizados são: extração por arraste a vapor, hidrodestilação, prensagem a frio, extração por solventes orgânicos, extração por alta pressão e extração por CO² supercrítico (AIYEGORO; OKOH, 2010).

Cada um com suas vantagens e desvantagens específicas, por exemplo, a enfloração, que já foi um método muito utilizado na obtenção dos óleos essenciais, mas

atualmente só é utilizado por algumas indústrias de perfumes, pois se trata de um método lento e caro (SILVEIRA et al., 2012). Ele se baseia em operações unitárias simples a absorção, filtração e a destilação, se baseia no poder que a gordura tem em absorver com eficácia os óleos essenciais devido às interações que acontecem entre as moléculas do óleo essencial e as da gordura (WOLFFENBUTTEL, 2010). O processo é geralmente empregado para pétalas de flores, estas são depositadas a temperatura ambiente sobre uma camada de gordura, com substituição das pétalas até a saturação total da gordura, que é tratada com álcool para obtenção do óleo. A prensagem ou expressão, técnica bastante utilizada para frutos cítricos, em que os pericarpos dos frutos são prensados e a camada que contém o óleo volátil separada, para ser posteriormente separado por decantação, centrifugação ou destilação fracionada.

A hidrodestilação é uma forma de extração em que o material vegetal está totalmente imersa em água, e aquecida até a ebulição. A água e o óleo essencial formam uma mistura homogênea, formando duas fases, o óleo menos denso fica na parte de cima (WOLFFENBUTTEL, 2010). A hidrodestilação é um método bastante versátil e eficiente, sendo a técnica mais utilizada em laboratório. Neste processo, evita-se a perda de compostos sensíveis a altas temperaturas, mas, em compensação, torna a destilação mais lenta e com menor rendimento (SILVEIRA et al., 2012).

No processo de hidrodestilação são formados dois produtos: o óleo essencial e o hidrolato. Esse hidrolato possui grande valor comercial, pois pode ser utilizado como fragrância nas indústrias de cosméticos, alimentos e farmacêuticas.

A extração por fluido supercrítico, em geral CO_2 , tem grande potencial pelo fato desses fluidos apresentarem propriedades físico-químicas intermediárias às de um líquido e um gás, consequentemente maximizando sua atuação como solvente. O fluido nesse estado apresenta uma alta densidade, com melhor poder de solvência e por ter uma alta capacidade de difusão e baixa viscosidade facilitando sua penetração na amostra. Após o equilíbrio entre a pressão da amostra e a pressão do ambiente, o fluido supercrítico volta ao estado gasoso sobrando apenas o óleo essencial (MOREIRA, 2017).

A técnica mais empregada para a obtenção de óleos essenciais é arraste de vapor, o processo consiste em passar vapor à temperatura de aproximadamente $100\text{ }^\circ\text{C}$ por um leito fixo de massa verde de planta aromática, interno a um vaso extrator. Pelo efeito da temperatura do vapor em fluxo ascendente, ocorre o rompimento das células odoríferas da planta aromática, em decorrência do aumento da pressão interna das células devido à vaporização parcial do óleo em seu interior. O óleo, em contato com o vapor, é arrastado para a parte superior do vaso extrator até o condensador. Isto ocorre devido à diferença de pressão entre a entrada de vapor

no vaso extrator e o bocal de saída de produto do condensador. Do bocal de saída do condensador, água e óleo essencial em emulsão (o condensado) são conduzidos por gravidade ao vaso de decantação/separação, chamado de vaso Florentino, onde ocorre a separação das fases. Parte do OE que se mantém emulsionado na água forma o hidrolato (CASSEL et al., 2009).

3.7 Atividade antimicrobiana da *Lippia alba*

O desenvolvimento de antimicrobianos nas últimas décadas, desde a descoberta das penicilinas naturais, e o avanço da indústria farmacêutica, levou ao surgimento de diversos antimicrobianos, com espectro de ação cada vez mais amplo. Entretanto, a exposição a essas substâncias desencadeou resistência bacteriana, limitando as opções terapêuticas dos processos infecciosos. A resistência de patógenos humanos e animais a drogas é um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. O uso indiscriminado e irresponsável de antibióticos, humano ou veterinário, tem favorecido a pressão seletiva e predominância de espécies bacterianas cada vez mais resistentes (DEL FIOL et al., 2010).

Dentre os grandes obstáculos para o tratamento das micoses humanas relacionado aos fungos, pode-se destacar: a crescente resistência aos fármacos antifúngicos, opções terapêuticas limitadas, toxicidade, interações medicamentosas e a biodisponibilidade diminuta das drogas antifúngicas presentes no mercado atual. Diante desta premissa surge grande necessidade de desenvolvimento de novos fármacos com maior eficácia e segurança, e nesta lógica, voltam-se os olhares para os fitoterápicos como um meio alternativo de tratamento (PIMENTA et al., 2019).

Assim, as plantas medicinais tem motivado cada vez mais a investigação científica de seus usos como alternativas terapêuticas, com avaliação de suas atividades antibacterianas e antifúngicas. Além disso, a pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos, utilizando as plantas medicinais como princípios ativos originam medicamentos em menor tempo, com custos inferiores e, conseqüentemente, mais acessíveis à população (BARBOSA; PEREIRA; FORTUNA, 2018).

A *Lippia alba*, é tradicionalmente usada como analgésica, antipirética, sedativa, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, no tratamento de doenças gastrointestinais e respiratórias, antiespasmódica, antifúngica, inseticida e repelente. É utilizada nas formas de chá, macerada, em compressas, banhos ou extratos e extraído seu óleo essencial (BANDEIRA et al., 2016).

As propriedades medicinais da *Lippia alba*, podem estar relacionadas ao teor de óleo essencial contida nela. A composição desse óleo é diferenciada de região para região, podendo sofrer influência do clima e do tipo de solo sobre a planta estudada (BARBOSA; PEREIRA; FORTUNA, 2018).

Vários estudos realizados com o óleo essencial e extratos das folhas de erva-cidreira *Lippia Alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) tem comprovado a ação antimicrobiana contra microrganismos patogênicos, tais como *Staphylococcus aureus*; *S. epidermidis* e *Escherichia coli* e ação antifúngica sobre *Candida albicans* (BARBOSA; PEREIRA; FORTUNA, 2018). A atividade antifúngica contra patógenos humanos foi relatado para gêneros como *Candida* e *Trichophyton* para os quimiotipos de óleos essenciais como citral e mirceno-citral assim como relatos sobre atividade antifúngica contra *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e gêneros de *Trichoderma*. (GEROMINI et al., 2015).

A atividade antifúngica de óleos essenciais de *Lippia alba* contra fungos patogênicos de seres humanos como *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. neoformans* e *Trichophyton rubrum* foi comprovado para quimiotipos citral e mirceno-citral, substâncias encontradas nos seus óleos essenciais (LINDE et al., 2016).

Portanto, tanto extrato como o óleo essencial da *Lippia alba* apresenta, segundo a literatura, atividade antimicrobiana em testes *in vitro* frente a cepas de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, e apresentam atividade positiva para inibição de fungos patogênicos.

4. METODOLOGIA

4.1 Coleta e identificação do material vegetal

A planta da região do semiárido paraibano, rica em óleos essenciais, foi selecionada de acordo com a indicação feita na literatura de sua atividade antimicrobiana. O material vegetal da *Lippia alba* foi coletada no município de Cuité – PB, no Horto Florestal Olho D'água da Bica, localizado no Centro de Educação e Saúde (CES), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), no período da manhã para posteriormente fazer a extração.

4.2 Preparação do extrato hidroalcolólico e testes fitoquímicos

Foram coletadas partes da planta, tanto folhas como flores, onde foi pesado em um béquer de vidro 50g da planta fresca (Figura 5). E preparado uma solução hidroalcolólico em uma proveta volumétrica com proporção 1:1 (v/v). Posteriormente, em um Erlenmeyer colocou-se a planta e o solvente extrator, seguiu-se a extração por maceração a temperatura ambiente, por 7 dias, ao abrigo da luz.

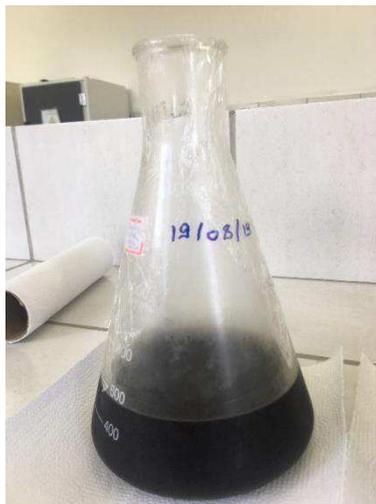
Figura 5 – 50 g de planta (*Lippia alba*)



Fonte: Dados da autora, 2019.

Após esse tempo foi filtrado e obtido um extrato de coloração verde escuro e conservado sob refrigeração com temperatura de 10°C (Figura 6).

Figura 6 – Extrato hidroalcolólico da *Lippia alba*



Fonte: Dados da autora, 2019.

Com a obtenção do extrato da *Lippia alba*, foram feitos testes fitoquímicos para análise dos metabolitos secundários da planta. Foram utilizados cinco tubos de ensaios, onde um foi o controle e os outros quatro serviram de testes fitoquímicos. Transferiu-se 2 ml de extrato para cada tubo, um tubo para identificação de teste de flavonóides, outro de taninos, alcalóides, e por fim terpenos. No tubo teste de flavonoides junto com o extrato adicionou-se um fragmento de magnésio metálico e duas a três gotas de ácido clorídrico concentrado (HCl). No tubo teste de taninos, adicionou-se três a quatro gotas de cloreto férrico a 5%. No tubo teste de alcalóides, adicionou-se três a quatro gotas do reagente de Dragendorff. No tubo teste dos terpenos, adicionou-se três a quatro gotas de anidrido acético acidificado com ácido sulfúrico concentrado. Todos os resultados das reações fitoquímicas, foram analisados e avaliados a partir de sua coloração.

4.3 Caracterização fitoquímica por cromatografia líquida de alta eficiência

Uma alíquota de 1 mL do extrato hidroetanólico foi submetido a caracterização por cromatografia líquida de alta eficiência. Foi utilizado detector de ultravioleta DGU-20ASR, forno para coluna CTO-20A, amostrador automático SIL-20AHT e o módulo bomba LC-20AT. As amostras foram submetidas a um tempo de análise de 30 minutos sob uma temperatura de 30 °C. O fluxo de bombeamento foi de 1mL/min. A fase móvel foi composta por metanol/água (v/v), no modo gradiente iniciando em 10% de metanol e aumentando para 70% em 20 min, com platô por 5 min, e retorno para a 10% até 30 min, A fase estacionária foi de fase reversa,

coluna analítica C18 Shim-pack CLC-ODS (250 x 4,6 mm DI), com tamanho da partícula de 5 µm. Com detecção de UV com arranjo de diodos, no comprimento de onda de 254 nm.

4.3 Obtenção dos óleos essenciais da *Lippia alba*

A extração dos óleos essenciais foi realizada usando um aparato de Clevenger contendo aproximadamente 30 g de material vegetal fresco da *Lippia alba* (Figura 7). O material vegetal foi colocado em um balão com água de capacidade de 500ml, e adicionado 300ml de água, acoplado a uma manta aquecedora e aquecido até ebulição, os óleos essenciais foram arrastados pelo vapor de água e condensados no aparato de Clevenger, que se encontrava com as paredes resfriadas com água gelada circulante, o processo de extração desse óleo levou cerca de 12 horas, realizado no laboratório J-14 (Bloco J) da Universidade Federal de Campina Grande *Campus* Cuité-PB. Após a o óleo essencial foi armazenado em frascos de vidro, vedado e armazenado sob refrigeração, com temperatura de aproximadamente -10°C em freezer até serem estudadas para fins microbiológicos.

Figura 7 – Aparato de Clevenger para extração do óleo.



Fonte: Dados da autora, 2019.

4.4 Determinação de resíduo seco

Para determinar a concentração do extrato foi utilizado uma adaptação da metodologia farmacopeia de determinação de resíduo seco. Nesse processo, uma alíquota de 1

mL do extrato líquido foi transferida para uma cápsula de porcelana previamente pesada. Em seguida, esse sistema teve seu volume reduzido a 1/3 com auxílio de aquecimento em chapa aquecedora a 60°C. O material foi então submetido a secagem em estufa por 4 horas a 100 °C e transferidas ao dessecador até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente, o material teve sua massa aferida em balança analítica e foi submetido a secagem em estufa por 1 hora para posterior pesagem até o valor constante.

4.5 Screening Microbiológico

Foram utilizados o extrato hidroalcólico da *Lippia alba* como também o seu óleo essencial nos testes microbiológicos. O extrato, por sua constituição não precisou de constituinte para solubiliza-lo, no entanto, o óleo essencial foi utilizado o Polissorbato 80 (Tween 80) 1% da Sigma-Aldrich®. Para avaliação do extrato e do óleo, foram utilizadas cepas de *Cryptococcus neofarmas* var neorfmans ATCC 66031, e cinco cepas do gênero *Candida* identificadas como *Candida albicans* ATCC 76485, *Candida tropicalis* INCQS 40042, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258 fornecidas pela Profª Drª Igara Lima e pelo Profº Drº Willy Araújo, ambos professores da UFCG-CES.

4.6 Meio de cultura e inóculo

Na realização dos experimentos para análise da atividade antifúngica da substância, foram utilizados os meios de culturas caldo Saboraud e o Ágar Saboraud Dextrose (DIFICO® - Laboratories LTDA). O preparo destes meios seguiu as instruções do fabricante e foram distribuídos em tubos e placas de ensaio ideais para os estudos microbiológicos.

As cepas foram repicadas no meio de cultura ágar saboraud dextrose, incubadas em estufa bacteriológica durante 48 horas a 37°C.

Para o controle padrão do teste da atividade antifúngica do extrato e do óleo essencial, foi utilizada a anfotericina B (Sigma Aldrich®).

Para o preparo do inóculo, retirou-se uma alíquota das cepas descritas previamente semeado em ASD e suspendeu-a em tubo com solução salina a 0,85% estéril. O inóculo foi ajustado de acordo com a escala de 0,5 Mc Farland em suspensão dos microrganismos em solução salina 0,85% estéril, correspondente a 5×10^6 UFC/mL.

4.7 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para a determinação da Concentração Inibitória mínima (CIM) do extrato e do óleo da referida planta, foi realizada a técnica de acordo com as normas M27-A2 do (CLSI, 2002; CLEELAND, SQUIRES, 1991; ELOFF, 1998). Foram distribuídos 100 µl do caldo Sabouraud Dextrose duplamente concentrado em placas de 96 orifícios e fundo em “U”. O extrato bruto foi diluído em água destilada em uma proporção de 1:1. Em seguida, foi distribuída 100µl desse extrato, somente na primeira linha e foi realizado a diluição seriada a uma razão de 2. O óleo essencial por suas propriedades precisou solubilizar em Polissorbato 80 (Tween 80) 1% da Sigma-Aldrich®, onde foi utilizado o óleo essencial a 5%, ou seja, 5 mL, com proporções de 10µL do óleo com 10µL do Tween 80 e 4980µL de água formando assim uma emulsão para assim proceder os testes microbiológicos, da mesma forma das diluições do extrato realizou-se para o óleo essencial. As duas últimas linhas corresponderam ao controle para avaliar a viabilidade das cepas (meio de cultura caldo sabouraud dextrose mais inóculo sem a substância analisada) e a esterilidade do meio de cultura (caldo sabouraud sem a substância testada).

Com auxílio de uma pipeta de 10 µL, foi adicionado o inóculo em cada uma das cavidades da placa. Foram feitos os controles com antifúngico padrão (anfotericina B) e de esterilidade. O ensaio foi realizado em triplicata e incubado a 37 °C por 48 h.

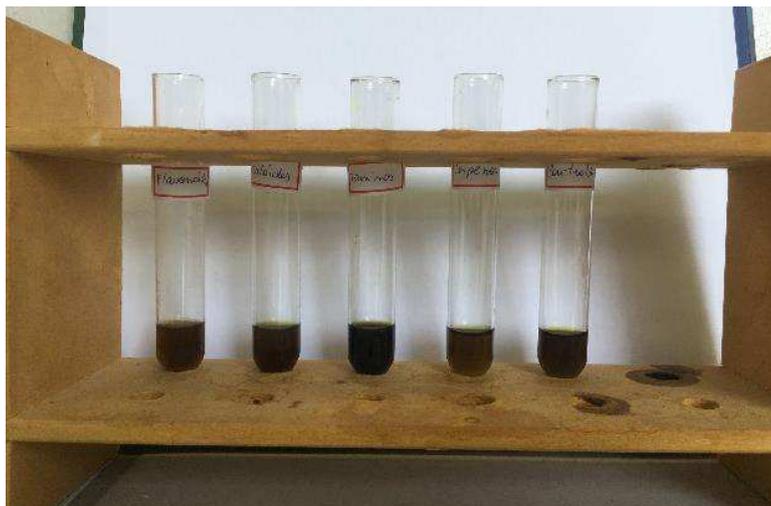
Após o período de incubação, procedeu-se a leitura da placa, visualmente, pela ausência ou presença de crescimento do microrganismo através da mudança do aspecto límpido para turvo, indicando crescimento do fungo.

Com isso, foi determinada a CIM, a menor concentração da substância capaz de inibir o crescimento do fungo analisado, verificado por uma não mudança de aspecto límpido da cavidade da placa.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da fração destinada à pesquisa fitoquímica foi possível obter um extrato hidroalcoólico bruto de coloração verde escura. Os resultados estão apresentados no quadro 1 e figura 8.

Figura 8 – Resultado da análise visual da *Lippia alba*.



Fonte: Dados da autora, 2019.

Quadro 1 – Resultados da fitoquímica da *Lippia alba*

Controle (Extrato)	Flavonoides	Alcaloides	Taninos	Terpenos
	(-)	(+)	(+)	(-)

Fonte: Dados da autora, 2019.

Esses resultados foram positivos e comparados aos estudos anteriores, em que foi realizada uma triagem fitoquímica da espécie *Lippia alba* a partir de suas folhas, que foi possível identificar a presença de flavonoides e taninos. A presença destas duas classes químicas nesta espécie pode justificar a atividade antimicrobiana observada por outros autores, uma vez que os compostos fenólicos são conhecidos por tal propriedade, além da presença de alcaloides, cumarinas e esteroides, corroborando para este trabalho (GOMES et. al., 2016).

Estudo realizado por Mota; Dantas; Frota (2018) mostraram que a análise fitoquímica feita a partir do extrato etanólico da *Lippia alba*, percebe-se a ocorrência de

alcaloides, cumarinas, flavonoides, metilxantinas, quinonas, saponinas e taninos, estando associados à ação antibacteriana e antitumoral, interligados pelo seu óleo essencial que também está relacionado com essas atividades.

Nos estudos realizados por Mantovani; Porcu (2009), os testes fitoquímicos mostraram que as folhas de *Lippia alba* em extrato aquoso 10% (m/v) para os metabólitos secundários notou-se a presença de glicosídeos e saponínicos e taninos através da reação com sais de ferro III. A presença destas substâncias indicou a diversidade de constituintes funcionais da planta *Lippia alba*. Mostrando a diferença do tipo de extrato utilizado, mas que apresentaram positivo para os taninos.

Segundo Souza et al. (2017), foi realizada a triagem fitoquímica dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Lippia alba*, e identificado que para fenóis e taninos utilizando cloreto férrico, foi visto como negativo, resultado diferente do presente trabalho. Souza et al. (2017) como seguinte foi identificado coloração específica com resultados positivos somente para flavanonas, flavanonóides e xantonas.

A erva-cidreira foi selecionada por pesquisadores para estudo de sua atividade medicinal tanto pela extração do seu óleo essencial como pela utilização de seus extratos, utilizada no combate de cólicas abdominais, afecções gástricas, ansiedade e também como uso antimicrobiano, percebeu-se as substâncias bioativas encontradas na referida planta, como terpenos e flavonoides, além das substâncias dos seus óleos essenciais (OLIVEIRA et al., 2015).

Segundo Menezes Filho e Souza Castro (2019) encontraram a presença de taninos totais e hidrolisáveis e ausência de reação positiva para taninos condensados em extrato aquoso foliar da *Lippia alba*.

Em relação ao resíduo seco, os valores obtidos foram, com a pesagem do cadinho seco foi de 51,48 e após todo o processo de secagem na estufa do extrato obteve um valor de 51,49, que totalizou em um rendimento de 1%, ou 0,01g.

Através da análise por cromatografia líquida de alta eficiência foi possível obter o perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico de *Lippia alba* (Figura 9).

Figura 9: Perfil cromatográfico de *Lippia alba*.



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Em relação a análise da atividade antimicrobiana do extrato e do óleo testado frente as cepas, como mostra o (Quadro 2), os resultados dos testes microbiológicos do extrato frente as cepas testadas, em que se percebeu atividade antifúngica do extrato de *Lippia alba* para a cepa 1, identificada como *Cryptococcus neoformans* var *neorfmans* ATCC 66031, com aspecto límpido e as outras cepas foram consideradas negativas em relação a atividade microbiológica pois houve crescimento dos microrganismos.

Quadro 2 – Determinação da CIM do extrato hidroalcolólico da *Lippia alba* (Erva Cidreira).

Proporção do extrato de <i>Lippia alba</i>	Microorganismos Testadas					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
1:2	-	+	+	+	+	+
1:4	-	+	+	+	+	+
1:8	-	+	+	+	+	+
1:16	-	+	+	+	+	+
1:32	-	+	+	+	+	+
1:64	-	+	+	+	+	+
1:128	-	+	+	+	+	+
1:256	-	+	+	+	+	+

Fonte: Dados da autora, 2019.

Legenda: C1: *Cryptococcus neoformans* var *neorfmans* ATCC 66031; C2: *Candida albicans* ATCC 76485; C3: *Candida tropicalis* INCQS 40042; C4: *Candida glabrata* ATCC 90030; C5: *Candida parapsilosis* ATCC 22019; C6: *Candida krusei* ATCC 6258.

Em relação ao óleo essencial da *Lippia alba* através do mesmo experimento, o quadro 3 apresenta os resultados da atividade antifúngica dessa substância frente as cepas

testadas em laboratório. Constatada pela tabela, que apenas a cepa 1 (*Cryptococcus neoformans* var *neofarmans* ATCC 66031) teve sua atividade fúngica inibida pelo óleo.

Quadro 3 – Determinação da CIM do óleo essencial da *Lippia alba* (Erva Cidreira).

Óleo essencial de <i>Lippia alba</i> 5%	C1	C2	C3	C4	C5	C6
	-	+	+	+	+	+

Fonte: Dados da autora, 2019.

Legenda: C1: *Cryptococcus neoformans* var *neofarmans* ATCC 66031; C2: *Candida albicans* ATCC 76485; C3: *Candida tropicalis* INCQS 40042; C4: *Candida glabrata* ATCC 90030; C5: *Candida parapsilosis* ATCC 22019; C6: *Candida krusei* ATCC 6258.

Os resultados para o fármaco Anfotericina B que foi o controle para avaliar se as substâncias possuem atividade antifúngica, no quadro 4.

Quadro 4 – Determinação da CIM do fármaco controle Anfotericina B.

Concentração da Anfotericina B	Microorganismos Testadas					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
32 µg/mL	-	-	-	-	-	-
16 µg/mL	-	-	-	-	-	-
8 µg/mL	-	-	-	-	-	-
4 µg/mL	-	-	-	-	-	-
2 µg/mL	-	-	-	-	-	-
1 µg/mL	-	-	-	-	-	-
0,5 µg/mL	-	-	-	-	-	-
0,25 µg/mL	-	-	-	-	-	-

Fonte: Dados da autora, 2019.

Legenda: C1: *Cryptococcus neoformans* var *neofarmans* ATCC 66031; C2: *Candida albicans* ATCC 76485; C3: *Candida tropicalis* INCQS 40042; C4: *Candida glabrata* ATCC 90030; C5: *Candida parapsilosis* ATCC 22019; C6: *Candida krusei* ATCC 6258.

Estudos realizados por Aguiar et al. (2008), que investigaram pelo método de difusão em disco de papel descrito por Bauer et al. (1996), a atividade antimicrobiana dos extratos hexânico, clorofórmico, acetônico, etanólico, metanólico e aquoso de raiz, caule e folhas da *Lippia alba* chegando à conclusão de que apenas os extrato clorofórmico, acetônico

e etanólico da raiz foram ativos frente a *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Candida albicans* e *Monilia sitophila* e os extratos hexânico, etanólico e metanólico das folhas inibiram *S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *M. smegmatis* e *M. sitophil*. Dentre os resultados apresentados pelos autores, mostra que o extrato etanólico inibiu o microrganismo *Candida albicans*, e no presente estudo o extrato hidroalcolico na proporção 1:1 não apresentou a devida eficácia de atividade antifúngica.

Em uma pesquisa feita utilizando frações proteicas extraídas da *Lippia alba* para avaliar o seu potencial antimicrobiano em *Staphylococcus spp.* provenientes de alimentos de origem animal, percebeu-se que as frações proteicas foram obtidas do extrato bruto da Erva Cidreira, a metodologia aplicada foi em placas de Petri com discos medindo os halos de inibição, sendo assim, alcançaram resultados positivos das proteínas extraídas das folhas de erva cidreira frente a *Staphylococcus spp* (BANDEIRA et al., 2016).

Autores como Tagami et al. (2009) realizaram estudos para testar a atividade fungicida de extratos brutos aquosos isoladamente e na junção das plantas *Bidens pilosa*, *Thymus vulgaris*, *Lippia alba* e *Rosmarinus officinalis*, em relação ao extrato de *Lippia alba* quando em mistura com *Rosmarinus officinalis*, levaram aos melhores resultados, reduzindo em até 60% o crescimento de *Alternaria alternata*, do que os extratos brutos aquosos isoladamente, obtendo uma ação fungitóxica significativa.

Em relação a cepa que obteve resultado sobre o extrato de *Lippia alba*, foram analisados estudos de Esper et al. (2019) que realizaram uma análise da atividade antifúngica da planta *Stryphnodendron adstringens* in vitro contra *Cryptococcus neoformans* foram utilizados os métodos experimentais na determinação da CIM através da técnica de microdiluição em placa, mesma técnica utilizada por o presente estudo. O autor utilizou um extrato hidroalcolico, onde essa solução de *Stryphnodendron adstringens*, apresentou atividade inibitória moderada in vitro contra de cepas de *Cryptococcus neoformans*, indicando um potencial antifúngico, possivelmente devido aos seus compostos fenólicos, taninos e flavonoides. Mesmo com espécies diferentes percebemos que a técnica utilizada foi validada com a utilização de um mesmo tipo de extrato obtendo atividade contra a mesma cepa *Cryptococcus neoformans*. Relacionando com o presente estudo, a atividade da cepa foi inibida pelo mesmo tipo de extrato, mas com um tipo de planta diferente.

Segundo os autores Cuadros e Rivera (2018), diante do seu estudo, apresentaram que *Candia albicans* apresentou sensibilidade aos extratos da *Lippia alba* diluídos em hexano, clorofórmio, acetona e etanol utilizando as técnicas de diluições seriadas, porém, nas avaliações sob essas mesmas técnicas, apresentou resistência em metanol e acetato de etila. *Candida*

parapsilosis e *Candida tropicalis* apresentaram sensibilidade aos extratos diluídos em etanol e resistência em etanol e água usando diluições em série. Resultados diferentes desse estudo onde foram utilizadas o mesmo tipo de microorganismo e extrato.

Em relação aos óleos essenciais da planta, vários estudos mostram sua eficaz atividade frente a microrganismos, sejam bactérias ou fungos. Segundo Oliveira, et al. (2006) foram testados nos óleos essenciais de *Lippia alba* no ensaio antimicrobiano que foi realizado utilizando o método de difusão descrito por (HILL, 1997), onde o microorganismo *Cryptococcus neoformans* T1-444 sorotipo A, desenvolveu atividade antifúngica frente aos óleos da planta, quando comparado com o controle que foi realizado com a drogas testes. Onde os microrganismos (2×10^5 células) foram espalhadas sobre placas de Petri contendo o meio sólido BHI (Brain Heart Infusion) e após 10 min, foi utilizado 10 μ L do óleo essencial diluído 1: 1 com Tween 80 (0,5% em água). Da mesma forma 10 μ L de antibióticos de referência (1 mg / mL, Tween 80 0,5% em água), foram utilizados como controles positivos, que foram testados: anfotericina B, metilicina e vancomicina. Todas as placas foram incubadas a 37 ° C e o tempo de incubação variou de 24 horas a 7 dias, após o qual foi medido o diâmetro (cm) da zona de inibição. O efeito do Tween 80 (0,5% em água) no crescimento microbiano também foi analisado não interferindo, assim os resultados obtidos para todas as concentrações de óleo que foram utilizados foram positivos, viabilizando o trabalho.

Já a pesquisa realizada por Barbosa, Pereira e Fortuna (2018), a partir dos óleos essenciais da *Lippia alba* a extração do seu óleo ocorreu pelas flores e folhas por hidrodestilação utilizando o aparato de Clevenger, mesma técnica utilizada por esse estudo, foi testado a capacidade desse óleo em inibir a atividade fúngica de *Candida albicans* utilizando o método de difusão de discos com diferentes concentrações do óleo, o controle do teste foi feito com droga nistatina. A partir dos resultados obtidos observamos que o óleo da folha se mostrou mais expressivo, uma vez que houve inibição em todas as concentrações testadas, diferente do óleo da flor que inibiu apenas na concentração de 100%. Embora haja essa diferença entre a ação inibitória dos óleos dos tecidos vegetais, os autores comprovaram que ambos apresentaram resposta frente a *Candida albicans* comprovando que a planta tem um potencial fitoterápico. Em relação ao nosso estudo, o óleo essencial não obteve atividade frente as cepas de *Candida albicans*, esse resultado pode estar relacionado a metodologia da microbiologia aplicada, como também as variantes, época de colheita, partes da planta utilizada, região onde ela está inserida, dentre outros aspectos que interferem.

Em relação aos estudos realizados por Cortez et al. (2015) foram utilizadas as folhas da *Lippia alba* que foram submetidas a secagem a temperatura ambiente durante dez dias para

posterior extração do óleo, essa extração foi utilizada também a técnica de hidrodestilação com o aparelho de Clevenger, onde foi realizada a técnica de microdiluição em placas, dentre os resultados obtidos foram estabelecidos pela CIM sobre as cepas de *Candidas albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, foi feita a análise pelo óleo isoladamente como também pela mistura com *Cymbopogon citratus* ambos em volume igual, não houve diferença entre a atividade antifúngica de *Lippia alba* e a mistura de óleos frente todas as cepas testadas, visto que a concentração fungicida mínima foi obtida demonstrando atividade eficaz.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, conclui-se que o extrato hidroalcolico da *Lippia alba* apresenta em seus constituintes químicos alcalóides e taninos, substâncias possivelmente relacionadas com seus metabólitos secundários e potencial atividade antimicrobiana. O método desenvolvido por CLAE apresentou boa resolução e baixo consumo de solvente, e o desenvolvimento do perfil cromatográfico do extrato hidroalcolico é uma ferramenta importante para o CQ e análise sazonal da planta selecionada. A atividade antifúngica do seu extrato e óleo essencial contra as cepas de *Cryptococcus neoformans* var *neorfmans* ATCC 66031 Tal fato corrobora o uso dessa planta com atividade antimicrobiana, como uma nova alternativa terapêutica em virtudes dos medicamentos convencionais e em relação a negatividade da atividade nas outras cepas testadas, seria a questão de sazonalidade e região que a planta está inserida, como outros interferentes estacionais.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, Jaciana S. et al. Antimicrobial activity of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 436-440, 2008.

AIYEGORO, O. A.; OKOH, A. I. Preliminary phytochemical screening and in vitro antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium* DC. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, n. 1, p. 21, 2010.

BADKE, M. R. et al. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, v. 15, n. 1, p. 132-139, 2011.

BANDEIRA, M. G. L. et al. Perfil de sensibilidade de *Staphylococcus* spp. isolados de alimentos de origem animal ao extrato bruto e a fração proteica obtida de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 38, n. 2, p. 163-167, 2016.

BARBOSA, C. S.; PEREIRA, R. F.; FORTUNA, Jorge Luiz. Atividade antifúngica do óleo essencial de erva-cidreira *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae) sobre *Candida albicans*. **Revista Biociências**, v. 23, n. 1, p. 53-60, 2018.

BRASIL. Secretaria Executiva. **Secretaria de Atenção Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia em Insumos Estratégicos**. Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. Brasília: 2006.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, Cid Manso de Melo. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, p. 2675-2685, 2012.

CORTEZ, L. E. R. et al. Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae) e *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (Poaceae). **Mundo Saúde (Impr.)**, v. 39, n. 4, p. [433-440], 2015.

CUADROS, M. O.; RIVERA, A. P. TOFINO. Revisión exploratoria de la actividad antibacteriana y antifúngica de *Lippia alba* (Mill.) NE Br. (pronto alivio). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 24, n. 1, 2018.

CUNHA, A. L. B. et al. Caracterização química do óleo essencial de erva-cidreira, nas condições de Manaus, AM. In: **Embrapa Amazônia Ocidental-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. Horticultura Brasileira, Brasília, DF, v. 30, n. 2, p. S5780-5784, jul. 2012., 2012.

DA SILVEIRA, A. C. et al. Estudo da Composição dos Óleos Essenciais de três Genótipos de *Eucalyptus* spp. In: **Embrapa Florestas-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SEMANA DE APERFEIÇOAMENTO EM ENGENHARIA FLORESTAL DA UFPR, 2., 2018, Curitiba. Anais. Curitiba: CIFLOMA, 2018., 2018.

DE MENEZES FILHO, A. C. P.; DE SOUZA CASTRO, C. F.. Identificação das classes de metabólitos secundários em extratos etanólicos foliares de *Campomanesia adamantium*, *Dimorphandra mollis*, *Hymenaea stigonocarpa*, *Kielmeyera lathrophytum* e *Solanum lycocarpum*. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 9, n. 1, p. 89-101, 2019.

DE OLIVEIRA, L. S. et al. Plantas medicinais como recurso terapêutico em comunidade do entorno da reserva biológica do tinguá, RJ, Brasil—metabólitos secundários e aspectos farmacológicos. **InterSciencePlace**, v. 1, n. 17, 2015.

DE REZENDE, F. M. et al. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. **Laboratório de Ensino de Botânica**, p. 93, 2016.

DEL FIOL, F. de Sá et al. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2010.

ESPER, A. M. L. et al. Análise da Atividade Antifúngica do Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) in vitro contra *Cryptococcus neoformans*. **Revista de Iniciação Científica e Extensão**, v. 2, n. Esp. 1, p. 66-66, 2019.

ELOFF, J. N. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?. **Journal of ethnopharmacology**, v. 60, n. 1, p. 1-8, 1998.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nov na Esc**, v. 39, n. 2, p. 120-30, 2017.

FIRMO, W. da C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, 2012.

FUMAGALI E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GEROMINI, K. V. N. et al. Fungicidal effect of *Lippia alba* essential oil on a white-rot fungus. **Maderas. Ciencia y tecnología**, v. 17, n. 1, p. 29-38, 2015.

GODINHO, C. S. et al. Estudo fitoquímico de espécies arbóreas do cerrado. **Revista Multitexto**, v. 3, n. 2, p. 64-70, 2016.

GOMES, J. V. D.; FAITANINI, Rafael D.; BRASILEIRO, B. G.; SILVEIRA, D.; JAMAL, C. M. Phytochemical screening, thrombolytic and citotoxic activity evaluation of *Cecropia hololeuca* Miq. (Urticaceae), *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex P. Wilson (Verbenaceae) and *Zanthoxylum rhoifolium* Lam (Rutaceae). **Infarma-Pharm Sci**, v. 28, n. 1, p. 10-5, 2016.

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

LINDE, G. A. et al. **Quimiotipos, extracción, composición y aplicaciones del aceite esencial de *Lippia alba***. 2016.

MANTOVANI, D.; PORCU, O. M. Avaliação fitoquímica do extrato de *Lippia Alba* para utilização como antioxidante natural em alimentos. **Revista Tecnológica**, v. 18, n. 1, p. 69-74, 2009.

- MIRANDA, C. A. S. F. et al. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 213-220, 2016.
- MOREIRA, M. R. L. F.. **Caracterização do óleo extraído da casca e coroa do abacaxi (*ananas comosus l. merril*)**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- MOTA, A. P. P.; DANTAS, J. C. P.; FROTA, C. C. Antimicrobial activity of essential oils from *Lippia alba*, *Lippia sidoides*, *Cymbopogon citrates*, *Plectranthus amboinicus*, and *Cinnamomum zeylanicum* against *Mycobacterium tuberculosis*. **Ciência Rural**, v. 48, n. 6, 21 jun. 2018.
- OLIVEIRA, D. R. et al. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 1, p. 103-108, 2006.
- OLIVEIRA, F. C. S.; BARROS, R. F. M.; MOITA NETO, J. M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 282-301, 2010.
- OLIVEIRA, T. B. et al. The Use of *Lippia* in the Treatment of Periodontal Diseases. **Journal of Dentistry & Public Health**, v. 9, n. 3, p. 227-237, 2018.
- PARACAMPO, N. E. N. P. et al. "**Fingerprinting**" e análise multivariada aplicados ao estudo de identidade e qualidade de fitoproducto de ajuru ("**Chrysobalanus icaco**" **Linnaeus**). 2017.
- PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.3, n.4, p.146-152, 2012.
- PIMENTA, E. et al. Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. (Lamiaceae) contra cepas de *Candida glabrata*. **Scientia Plena**, v. 15, n. 6, 2019.
- PINTO, P. S.. **Terpenóides em espécies do gênero *Salvia* (Lamiaceae)**. 2012.

RIBEIRO, D. S. et al. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) como modulador da resistência bacteriana. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 687-695, 2012.

ROSA, C.; CÂMARA, S. G.; BÉRIA, J. U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciências & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 311 - 318, 2011.

SILVA, F. et al. Coriander (*Coriandrum sativum L.*) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. **Journal of Medical Microbiology**, ago. 2011, disponível em: Acesso em 17 nov. 2011.

SILVEIRA, J. C. et al. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 2038-2052, 2012.

SOUZA, C. A. S. et al. Controle de qualidade físico-químico e caracterização fitoquímica das principais plantas medicinais comercializadas na feira-livre de Lagarto-SE. **Scientia Plena**, v. 13, n. 9, 2017.

TAGAMI, O. K. et al. Fungitoxidade de *Bidens pilosa*, *Thymus vulgaris*, *Lippia alba* e *Rosmarinus officinalis* no desenvolvimento in vitro de fungos fitopatogênicos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 2, p. 285-294, 2009.

TAVARES, I. B.; MOMENTÉ, V. G. ; DO NASCIMENTO, Ildon Rodrigues. *Lippia alba*: estudos químicos, etnofarmacológicos e agronômicos. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, 2011.

WOLFFENBÜTTEL, A. N. Base da química dos óleos essenciais e aromaterapia: abordagem técnica e científica. **São Paulo: Roca**, 2010.