



Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes

E.S. Tavares^{1*}, L.S. Julião¹, D. Lopes², H.R. Bizzo², C.L.S. Lage³, S.G. Leitão⁴

¹Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rua Brigadeiro Trompovsky s/n, Ilha do Fundão, 21951-590, Rio de Janeiro, RJ, Brasil,

²Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos, EMBRAPA, Av. das Américas, 29501, 23020-470, Rio de Janeiro, RJ, Brasil,

³Laboratório de Fisiologia Vegetal, Instituto de Biofísica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brasil,

⁴Departamento de Produtos Naturais e Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

RESUMO: A composição do óleo essencial de *Lippia alba* apresenta variação quantitativa e qualitativa, levando à separação em quimiotipos. O trabalho tem como objetivo analisar o óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba*, provenientes de diferentes regiões do Brasil, cultivados em condições semelhantes, a fim de verificar se as diferenças na composição do óleo devem-se a fatores ambientais ou a variação genética infraespecífica e se a floração influencia o rendimento e a composição do óleo. Os quimiotipos produtores de citral, carvona e linalol, foram denominados *Lippia alba* 1, 2 e 3, respectivamente. Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação de folhas e analisados por cromatografia com fase gasosa e cromatografia com fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. O melhor rendimento foi obtido das plantas no estágio vegetativo. A composição do óleo essencial manteve-se inalterada para os três quimiotipos após cultivo em condições semelhantes e também não variou qualitativamente durante o crescimento vegetativo e floração. Os dados obtidos reforçam a idéia que as diferenças na composição do óleo essencial dos quimiotipos refletem variações genótípicas entre as plantas e que a extração de óleo essencial de *L. alba* deve ser efetuada na fase de crescimento vegetativo, quando é maior o rendimento do óleo e a porcentagem dos componentes majoritários.

Unitermos: *Lippia alba*, Verbenaceae, óleo essencial, citral, carvona, linalol.

ABSTRACT: "Analysis of the essential oil from leaves of three *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) chemotypes cultivated on the same conditions". The composition of *Lippia alba* essential oil varies in a manner that different chemotypes are recognized. This work deals with the analysis of the essential oil from three chemotypes of *L. alba* from different regions of Brazil, cultivated in similar conditions, to verify if the differences in their chemical composition can be due to environmental conditions or may be due to infra-specific genetic variation. The influence of flowering was investigated regarding essential oil yield and composition. The chemotypes producing citral, carvone and linalol were denominated chemotypes 1, 2 and 3, respectively. The essential oils were obtained by hydrodistillation of the leaves, at flowering and vegetative growth stages. Essential oils were analyzed by GC and GC/MS. A better yield was obtained from plants at vegetative stage. The composition of the essential oils remained unchanged after cultivation in the same conditions, and did not vary qualitatively during flowering and vegetative periods. Relative percentages of the major compounds changed during flowering period. Data obtained allow us to reinforce the idea that differences in the essential oil composition of the three chemotypes are due to genotypic variations and that the essential oil extraction during the vegetative period enables a better yield and higher percentages of the major compounds.

Keywords: *Lippia alba*, Verbenaceae, essential oil, citral, carvone, linalol.

INTRODUÇÃO

Lippia alba ocorre nas américas Central e do Sul, habitando praticamente todas as regiões do Brasil, onde é muito empregada como medicinal, pelas

suas propriedades sedativa, carminativa, analgésica, espasmolítica e emenagoga (Zétola et al., 2002; Vale et al., 1999; Matos et al., 1996). A composição de seu óleo essencial apresenta variação quantitativa e qualitativa, levando à separação em quimiotipos (Matos

et al.,1996; Frigheto et al., 1998; Zoghbi et al.,1998), os quais poderiam apresentar atividades farmacológicas distintas, bem como diferenças morfológicas (Matos, 1996; Corrêa, 1992). As variações na composição do óleo essencial e características morfológicas têm sido observadas dependendo da origem geográfica do material, o que levou à hipótese de que seriam conseqüência da influência de fatores ambientais. (Retamar, 1994; Zoghbi et al.,1998).

Este trabalho tem como objetivo a análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba*, provenientes de diferentes regiões do Brasil, cultivados em condições semelhantes, a fim de verificar se as diferenças na composição do óleo essencial devem-se a fatores ambientais ou a variação genética infra-específica. Adicionalmente, verificou-se se a floração influencia o rendimento e a composição do óleo.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Estacas enraizadas dos três quimiotipos de *Lippia alba*, denominados *Lippia alba* 1, 2 e 3, os quais produzem como componente majoritário no óleo essencial o citral, a carvona e o linalol, respectivamente, foram plantadas no Horto do Departamento de Botânica - UFRJ, em um mesmo canteiro, em local parcialmente sombreado, com distância mínima de 30 cm entre elas, em covas de aproximadamente 20 cm de diâmetro, preenchidas com terra adubada com estrume de vaca, onde cresceram sob rega diária. Os quimiotipos são provenientes do estado do Rio de Janeiro (1), do estado do Ceará (2), e do estado de São Paulo (3), respectivamente e foram cedidos pelo Prof. Dr. Benjamin Gilbert, de Farmanguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro. Foram analisados três indivíduos de cada quimiotipo, com mais de 1 ano após o plantio.

Ramos férteis foram depositados, como exsiccatas, no Herbário do Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, UFRJ (RFA), registradas sob os números 29421, 29422 e 29423, respectivamente. A identificação foi feita pela Dr^a. Fátima Regina Gonçalves Salimena, da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

Extração e análise dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação, empregando extrator descrito na Farmacopéia Brasileira, IV edição, durante 2h, de mistura de folhas de três indivíduos de cada quimiotipo de *L. alba* cultivados no horto do Departamento de Botânica, perfazendo 100 g para cada quimiotipo. O óleo foi extraído em agosto de 2000, época em que as plantas encontravam-se em floração, e em março de 2001, quando as plantas encontravam-se em fase de crescimento vegetativo. O rendimento em óleo foi medido em g/g de peso fresco. Os valores foram determinados a partir de amostra composta de 3 indivíduos de cada quimiotipo.

A análise por cromatografia com fase gasosa (CG) foi efetuada em aparelho em equipamento Agilent HP 5890, serie II, sob as seguintes condições experimentais: coluna capilar de sílica fundida com 5% de fenilmetilsilicona (PE-5) com 20m x 0.18.mm D. I., com 0.4µm de espessura de fase, fluxo de 1mL min⁻¹ de hidrogênio como gás de arraste; temperatura do injetor de 250°C; temperatura do detector (FID) 300°C; aquecimento da coluna programado para 60° - 240°C at 3°C min⁻¹. Para cada quimiotipo e cada estágio de desenvolvimento foram analisadas amostras compostas do óleo de três indivíduos. Análise por CG/EM empregou detector de massas Agilent 5973 MSD acoplado a cromatógrafo a gás modelo 6890, tendo Hélio como gás de arraste, mesma coluna e condições descritas acima. A temperatura da interface foi de 240°C, fonte de íons, 230°C (70eV) e a faixa de massas de 40 a 400 uma. O tempo de retenção foi medido em minutos. Para cada quimiotipo foram analisadas amostras compostas do óleo de três indivíduos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Rendimento durante o crescimento vegetativo e floração

A quantidade de óleo essencial de folhas, extraído por hidrodestilação e medido em g/g de peso fresco, variou de acordo com a época do ano (Tabela 1). O menor rendimento foi observado na época em que as plantas encontravam-se em floração. Resultados discrepantes foram observados por Gupta et al. (2002) em estudo com *Artemisia annua*, onde a maior porcentagem de óleo essencial foi obtida a partir de plantas em floração. Por outro lado, Atti et al. (2002) referem que em plantas de

Tabela 1. Rendimento médio em óleo essencial de folhas de *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. coletadas durante o crescimento vegetativo e floração.

	Rendimento médio(g/g de peso fresco)	
	Floração	Crescimento vegetativo
<i>L. alba</i> 1	0,15%	0,30%
<i>L. alba</i> 2	0,40%	0,50%
<i>L. alba</i> 3	0,40%	0,60%

Tabela 2. Componentes do óleo essencial de folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br., quimiotipos 1, 2 e 3, coletadas em agosto de 2000 quando as plantas encontravam-se em floração. TR= Tempo de retenção, %= porcentagem relativa, IK C= Índice de Kovats calculado.

Componente	<i>L. alba</i> 1			<i>L. alba</i> 2			<i>L. alba</i> 3		
	TR	%	IK C	TR	%	IK C	TR	%	IK C
3-Z-Hexenol	3,23	1,48	857	-	-	-	3,22	0,14	856
α -Tujeno	4,84	0,15	931	4,83	0,18	931	4,83	0,05	931
α -Pinenol	5,03	0,32	939	5,03	0,12	938	5,03	0,07	938
Sabineno	6,15	0,48	977	6,15	2,02	977	6,14	1,23	977
1-Octen-3-ol	6,36	3,26	983	-	-	-	6,25	0,05	980
6-Metil-5-hepten-2-ona	6,59	3,46	990	-	-	-	6,34	1,18	983
Mirceno	6,66	2,34	992	6,65	0,40	992	6,64	0,38	992
α -Terpineno	-	-	-	7,54	0,10	1020	-	-	-
<i>p</i> -Cimeno	7,81	0,33	1028	-	-	-	-	-	-
Limoneno	7,97	0,25	1032	8,00	16,98	1033	7,96	0,27	1032
1,8-Cineol	-	-	-	-	-	-	8,16	5,96	1038
Z- β -Ocimeno	8,27	0,18	1041	-	-	-	8,26	0,06	1040
<i>E</i> - β -Ocimeno	8,66	0,51	1051	8,65	0,56	1051	8,65	0,56	1051
γ -Terpineno	-	-	-	9,07	0,23	1062	-	-	-
<i>cis</i> -Hidrato de sabineno	-	-	-	-	-	-	9,50	0,19	1073
<i>trans</i> -Hidrato de sabineno	-	-	-	9,50	0,82	1073	-	-	-
<i>trans</i> -Óxido de linalol	-	-	-	-	-	-	10,37	0,10	1093
Linalol	10,52	0,07	1096	10,76	1,48	1102	10,98	60,05	1108
1,3,8- <i>para</i> -Mentatrieno	-	-	-	-	-	-	11,04	0,11	1110
<i>cis</i> -Verbenol	12,36	0,14	1143	12,16	0,11	1138	-	-	-
Isobutirato de Z-3-hexenila	-	-	-	-	-	-	12,53	0,19	1147
Citronelal	12,72	0,14	1152	12,73	0,13	1152	12,73	0,12	1152
Óxido de β -pineno	12,95	0,35	1157	-	-	-	-	-	-
Umbelulona	-	-	-	-	-	-	13,62	0,33	1172
α -Terpineol	-	-	-	-	-	-	14,66	0,48	1194
<i>cis</i> -Diidro carvona	-	-	-	-	-	-	14,87	0,04	1198
<i>trans</i> -Diidro carvona	-	-	-	-	-	-	15,12	1,94	1204
<i>trans</i> -Carveol	-	-	-	-	-	-	15,47	3,10	1213
Nerol	16,41	5,48	1235	-	-	-	-	-	-
Citronelol	-	-	-	-	-	-	16,37	0,21	1234
Neral	17,02	25,82	1249	-	-	-	16,87	0,43	1246
Carvona	-	-	-	17,19	52,8	1253	-	-	-
Geraniol	17,63	9,2	1263	-	-	-	17,01	0,13	1249
Geranial	18,38	33,98	1279	-	-	-	18,19	0,56	1275
α -Copaeno	22,87	0,27	1380	-	-	-	22,78	0,23	1378
Acetato de geranila	23,21	0,27	1387	-	-	-	-	-	-
β -Bourboneno	-	-	-	23,17	0,26	1386	-	-	-
β -Cubebeno	-	-	-	23,41	0,22	1391	23,41	0,22	1391
β -Elemeno	23,43	0,25	1392	23,50	0,41	1393	23,50	1,33	1393
<i>E</i> -Cariofileno	24,70	1,74	1422	24,67	0,29	1421	24,70	3,15	1422
β -Gurjuneno	25,09	0,10	1431	25,09	0,13	1431	25,08	0,14	1431
α -Humuleno	-	-	-	-	-	-	26,14	0,41	1456
<i>cis</i> -Muurolo-4(14) 5 dieno	26,15	0,12	1457	-	-	-	-	-	-
alo-Aromadendreno	26,27	0,18	1459	26,46	0,29	1464	26,45	0,22	1464
Germacreno D	-	-	-	27,33	5,94	1484	27,34	5,20	1484
Biciclogermacreno	-	-	-	-	-	-	27,97	0,23	1498
α -Muuroleno	-	-	-	27,98	0,29	1498	-	-	-
Germacreno A	-	-	-	28,14	0,15	1502	28,14	0,15	1502
β -Bisaboleno	-	-	-	28,33	0,16	1507	28,34	0,55	1507
γ -Cadineno	28,71	0,11	1516	-	-	-	-	-	-
δ -Cadineno	29,09	0,9	1526	28,85	0,17	1520	28,84	0,44	1520
α -Cadineno	-	-	-	-	-	-	29,74	0,14	1542
Elemol	-	-	-	30,24	4,95	1555	-	-	-
Germacreno B	-	-	-	-	-	-	30,49	2,61	1561
<i>E</i> -Nerolidol	30,76	0,38	1567	-	-	-	30,76	0,38	1567
Germacreno D-4-ol	-	-	-	-	-	-	31,26	0,14	1579
Total	-	92,2	-	-	89,1	-	-	93,5	-

Tabela 3. Componentes majoritários dos óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill) N. E. Br., quimiotipo 1, extraídos por hidrodestilação de folhas coletadas em agosto de 2000, quando as plantas encontravam-se em floração, e em março de 2001, quando encontravam-se em fase de crescimento vegetativo.

Componente	Teor (%)	
	Crescimento vegetativo	Floração
Z-3-Hexenol	0,94	1,48
1-Octen-3-ol	0,82	3,26
6-Metil-5-hepten-2-ona	0,72	3,46
Mirceno	0,45	2,34
Nerol	4,60	5,48
Neral	29,30	25,82
Geraniol	8,19	9,20
Geranial	42,77	33,98
E-Cariofileno	2,05	1,74

Os valores foram obtidos através de análise de amostra composta do óleo obtido de folhas de três indivíduos

Tabela 4. Componentes majoritários dos óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill) N. E. Br., quimiotipo 2, extraídos por hidrodestilação de folhas coletadas em agosto de 2000, quando as plantas encontravam-se em floração, e em março de 2001, quando encontravam-se em fase de crescimento vegetativo.

Componente	Teor (%)	
	Crescimento vegetativo	Floração
Sabineno	1,32	2,02
Limoneno	15,00	16,98
Carvona	61,78	52,80
Germacreno D	4,25	5,94
Elemol	3,20	4,95

Os valores foram obtidos através de análise de amostra composta do óleo obtido de folhas de três indivíduos

Tabela 5. Componentes majoritários dos óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill) N. E. Br., quimiotipo 3, extraídos por hidrodestilação de folhas coletadas em agosto de 2000, quando as plantas encontravam-se em floração, e em março de 2001, quando encontravam-se em fase de crescimento vegetativo.

Componente	Teor (%)	
	Crescimento vegetativo	Floração
Sabineno	0,77	1,23
6-Metil-5-hepten-2-ona	0,54	1,18
1,8-Cineol	4,22	5,96
Linalol	73,99	60,05
trans-Diidro carvona	1,86	1,94
trans-Carveol	1,99	3,10
β-Elemeno	2,82	1,33
E-Cariofileno	2,78	3,15
Germacreno D	1,73	5,20
Germacreno B	0,72	2,61

Os valores foram obtidos através de análise de amostra composta do óleo obtido de folhas de três indivíduos

L. alba coletadas em Caxias do Sul o maior rendimento em óleo ocorreu no período de dezembro a março. Como este é o período em que a espécie encontra-se em fase de crescimento vegetativo e, sabendo que a relação entre fase de crescimento e produção de óleo essencial é variável segundo a espécie estudada, podemos concluir que em *L. alba* a maior produção de óleo ocorre fora do período de floração.

Os valores foram obtidos utilizando-se, para cada quimiotipo, em cada estágio de desenvolvimento, amostras compostas do óleo obtido de folhas de três indivíduos.

Composição do óleo essencial analisado por cromatografia com fase gasosa

Os resultados das análises dos óleos essenciais de *L. alba* 1, 2 e 3 estão descritos na Tabela 2. Para *L. alba* 1 foram identificados 29 componentes, os quais representam 92,2% do óleo. Em *L. alba* 2 os 26 componentes identificados perfazem 89,1% do óleo. Em *L. alba* 3 foram identificados 42 constituintes, representando 93,5% do óleo.

A observação da Tabela 2 nos permite concluir que a diversidade na composição do OE dos quimiotipos estudados não se deve a fatores ambientais, já que plantas cultivadas lado a lado, em um mesmo canteiro, por mais de um ano, mantiveram a composição original. A diferença deve-se provavelmente à diversidade no genótipo das plantas. De fato, resultados preliminares de estudo citogenético demonstraram que o número cromossômico de pelo menos dois dos quimiotipos é diferente, o que denota processo de especiação (Tavares et al, 2003).

Os valores foram obtidos utilizando-se, para cada quimiotipo, análise de amostras compostas do óleo obtido de folhas de três indivíduos.

Análise do óleo essencial durante o crescimento vegetativo e floração

A análise dos óleos essenciais obtidos na época em que as plantas encontravam-se em floração e dos óleos extraídos anteriormente, quando a floração ainda não havia tido início, nos permite concluir que não houve variação qualitativa dos componentes majoritários nos dois períodos de vida das plantas (Tabelas 3, 4 e 5). Por outro lado a análise quantitativa destes elementos nos mostra que a porcentagem de citral (geranial + neral) carvona e linalol sofreu uma ligeira diminuição durante a época de floração (Tabelas 3, 4 e 5) ao passo que houve aumento na porcentagem do limoneno. Variações quantitativas na composição do óleo essencial durante a fase de crescimento vegetativo e a floração também foram observadas em *Artemisia campestris* var. *glutinosa* (Juteau et al., 2002) e *Artemisia annua* (Gupta et al., 2002).

CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente estudo reforçam a idéia de que as diferenças na composição do óleo essencial dos três quimiotipos não constituem produto da influência de fatores ambientais mas refletem variação genotípica entre as plantas já que tais diferenças mantiveram-se em plantas cultivadas lado a lado em um mesmo canteiro. Permitem-nos ainda concluir que a extração de óleo essencial de *L. alba* para a obtenção de citral carvona e linalol deve ser efetuada em plantas em fase de crescimento vegetativo quando o rendimento do óleo e os teores dos componentes majoritários são maiores.

REFERÊNCIAS

- Atti SL, Pansera MR, Atti SAC, Rossato M, Pauletti GF, Rotal D, Paroul N, Moyna P 2002. Variation in essential oil yield and composition of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. grown in southern Brazil. *Rev Bras Pl Med* 4: 72-74.
- Corrêa CBV, 1992. Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britt & Wilson – erva-cidreira. *Rev Bras Farm* 73: 57-64.
- Frighetto N, Oliveira JG, Siani AC, Chagas KC 1998. *Lippia alba* Mill N. E. Br. (Verbenaceae) as a source of linalool. *J Essent Oil Res* 10: 578-580.
- Gupta SK, Singh P, Bajpai P, Ram G, Digvijai S, Gupta MM, Jain DC, Khanuja SPS, Kumar S 2002. Morphogenetic variation for artemisin and volatile oil in *Artemisia annua*. *Ind Crop Prod* 16: 2217-2224.
- Juteau F, Masotti V, Bessiére JM, Viano J 2002. Compositional characteristics of the essential oil of *Artemisia campestris* var. *glutinosa*. *Biochem Syst Ecol* 30: 1065-1070.
- Matos FJA 1996. As ervas cidreiras do Nordeste do Brasil. Estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) Parte II – Farmacoquímica. *Rev Bras Farm* 77: 137-141.
- Matos FJA, Machado MIL, Craveiro AA, Alencar JW 1996. Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in northeast Brazil. *J Essent Oil Res* 8: 695-698.
- Retamar JA 1994. Variaciones fitoquímicas de la especie *Lippia alba* (salvia morada) y sus aplicaciones en la química fina. *Essenze Derivati Agrumari* 16: 55-60.
- Tavares ES, Julião LS, Leitão SG, Lage CLS, Viccini L, Pierre PMO, Davide LC 2003. Diferenças morfológicas, anatômicas e fisiológicas de dois quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. relacionadas à poliploidia. *VI Congresso de Ecologia do Brasil, Simpósio Biodiversidade, Unidades de Conservação, Indicadores Ambientais, Cerrado e Caatinga*. Fortaleza: Editora da Universidade Federal do Ceará, 99.
- Vale TG, Matos FJA, Lima TCM, Viana, GSB 1999. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown chemotypes. *J Ethnopharmacol* 67: 127-133.
- Zétola M, Lima TCM, Sonaglio D, Gonzáles-Ortega G, Limberger RP, Petrovick PR, Bassani VL 2002. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* - Verbenaceae (Brazilian false melissa). *J Ethnopharmacol* 82: 207-215.
- Zoghbi MGB, Andrade EHA, Santos AS, Silva MH, Maia JGS 1998. Essential oils of *Lippia alba* (Mill) N. E. Br growing wild in the Brazilian Amazon. *Flavour Frag J* 13: 47-48.