



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ – UECE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA – CCT
PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM RECURSOS NATURAIS
MESTRADO ACADÊMICO EM RECURSOS NATURAIS-MARENA**

ANA CAROLINA MOREIRA DE BARROS DUARTE

**PROSPECÇÃO DE PLANTAS NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO PARA UTILIZAÇÃO
EM INDÚSTRIAS DE AROMAS: PERFIL DE COMPOSTOS ODORÍFEROS DO
ÓLEO ESSENCIAL DE ACESSOS DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. BROWN**

FORTALEZA – CEARÁ

2016

ANA CAROLINA MOREIRA DE BARROS DUARTE

PROSPECÇÃO DE PLANTAS NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO PARA UTILIZAÇÃO EM INDÚSTRIAS DE AROMAS: PERFIL DE COMPOSTOS ODORÍFEROS DO ÓLEO ESSENCIAL DE ACESSOS DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. BROWN

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Recursos Naturais (Marena) do Programa de Mestrado Acadêmico em Recursos Naturais da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais. Área de Concentração: Recursos Naturais.

Orientadora: Prof.^a Dra. Deborah dos Santos Garruti.

FORTALEZA – CEARÁ

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Duarte, Ana Carolina Moreira de Barros.

Prospecção de plantas no semiárido brasileiro para utilização em indústrias de aromas: perfil de compostos odoríferos do óleo essencial de acessos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown [recurso eletrônico] / Ana Carolina Moreira de Barros Duarte. - 2016.

1 CD-ROM: il.; 4 1/2 pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 72 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências e Tecnologia, Mestrado Acadêmico em Recursos Naturais, Fortaleza, 2016.

Área de concentração: Aproveitamento de Recursos Naturais.

Orientação: Prof.^a Dra. Deborah dos Santos Garruti.

1. *Lippia alba*. 2. Óleos essenciais. 3. Compostos odoríferos. I. Título.

ANA CAROLINA MOREIRA DE BARROS DUARTE

PROSPECÇÃO DE PLANTAS NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO PARA UTILIZAÇÃO
EM INDÚSTRIAS DE AROMAS: PERFIL DE COMPOSTOS ODORÍFEROS DO
ÓLEO ESSENCIAL DE ACESSOS DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. BROWN

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Recursos Naturais (Manema) do Programa de Mestrado Acadêmico em Recursos Naturais da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais. Área de Concentração: Recursos Naturais.

Aprovada em: 29 / 02 / 16

BANCA EXAMINADORA

Deborah

Prof.^a Dr.^a Deborah dos Santos Garruti (Orientadora)

Embrapa Agroindústria Tropical – CNPAT

Kirley Marques Canuto

Dr. Kirley Marques Canuto

Embrapa Agroindústria Tropical – CNPAT

Rita de Cássia Alves Pereira

Dr.^a Rita de Cássia Alves Pereira

Embrapa Agroindústria Tropical – CNPAT

Dedico este trabalho primeiramente à Deus que me ajudou a perseverar apesar dos obstáculos e à minha querida mãe Ana Eurídice (*in memoriam*) que se alegraria com essa minha conquista.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me possibilitou trilhar essa estrada longa e cheia de obstáculos, mas em sua força eu consegui concluir a travessia.

À minha amada mãe, Ana Eurídice (*in memoriam*), por ter sido uma pessoa tão iluminada ao longo dos maravilhosos 18 anos que passei ao seu lado, pelas lições de amor a mim dedicadas e pela pessoa íntegra que você me ajudou a ser. Sei que ninguém se alegraria mais por mim hoje do que a senhora.

Ao meu adorado pai, José Humberto, que sempre faz o possível para me dar suporte perante os desafios do cotidiano.

À minha irmã, Ana Cristina, pelo companheirismo e amizade à mim dedicados. Aos meus tios, José Roberto, Paulo Roberto Alessandra e Elisângela, pela dedicação demonstrada em diversos momentos alegres e em outros tristes, ao amado primo Pedro, que tantas alegrias nos tem trazido.

Ao meu avô, José Maria, que tanto sonhou em me ver formada consegui também pelo senhor. À minha avó, Lucinda, por ter sido um exemplo de bondade e caridade. Ao meu avô Frutuoso pelo carinho e bondade demonstrados.

À minha orientadora Dra. Deborah Garruti pelos ensinamentos ao longo do curso, dedicação, paciência. Por ser uma brilhante profissional e, sobretudo um ser humano fantástico.

Ao Dr. Kirley Canuto e à Dra Rita de Cássia pelo exemplo de profissionais dedicados que com suas pertinentes correções que farão desse trabalho um importante veículo de conhecimento.

À Dra. Ídila Maria supervisora do laboratório de Análise Sensorial por todo o auxílio prestado, colaboração imprescindível para conclusão desse trabalho.

Aos membros e amigos da equipe do Laboratório de Análise de Alimentos da Embrapa CNPAT: Renier, Flávia, Wivian, Aline, Áfia e Hilton por toda a colaboração, esse trabalho ficou mais rico graças a vocês também.

Aos colegas e amigos de mestrado Augusta, Lia, Giuliane, Denis, Paulo Ricardo, Daniel, Carlos, Cíntia e Roberta pelo companheirismo, foi maravilhoso pertencer a essa turma, uma honra.

À EMBRAPA CNPAT por ter oferecido toda a estrutura física e intelectual para a realização desse trabalho.

À UECE e ao Mestrado em Recursos Naturais (MARENA) por todas as conquistas acadêmicas e pelos títulos concedidos.

À FUNCAP pela bolsa concedida, imprescindível para realização das atividades referentes a essa pesquisa.

RESUMO

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown (erva-cidreira) (Verbenaceae) é uma espécie vegetal que cresce sob a forma de erva ou arbusto. Há registros de sua ocorrência em países da América do Sul e Central, Europa e África. No Brasil desenvolve-se em todas as regiões evidenciando sua relevância para a pesquisa nacional. O óleo de *L. alba* desperta grande interesse para a indústria de aromas e fragrâncias, seja a mistura ou seus compostos individuais, de forma que se fazem necessárias análises dos óleos das variedades genótípicas da espécie em questão. Diversos estudos apontam a variabilidade genética dentro da espécie dividindo-a em quimiotipos, os quais determinam diferentes composições para o óleo de *L. alba* de acordo com os compostos majoritários. O presente trabalho objetivou determinar o perfil de voláteis do óleo essencial de novos genótipos de *Lippia alba*, prospectando materiais com potencial para utilização na indústria de aromas e investigar a ocorrência de diferentes quimiotipos. Foram obtidos os óleos essenciais da *Lippia alba* comum e de mais seis acessos cultivados no Horto de Plantas Medicinais da Embrapa Agroindústria Tropical (L07, L10, L15, L40, L42 e L43) por meio de hidrodestilação com aparelho de *Clevenger*. Os compostos voláteis foram analisados e quantificados em cromatógrafo com detector de ionização de chama (CG-DIC), utilizando a coluna RTX-5. Para identificação dos compostos houveram análises em cromatógrafo a gás acoplado à espectrômetro de massas (CG-EM), utilizando a coluna DB-5. A área dos picos dos cromatogramas foram analisadas por técnicas estatísticas multivariadas de Agrupamento Hierárquico (clusters) e Análise de Componentes Principais (ACP). Foi aplicado o teste sensorial CATA Check-all-that-apply para caracterização qualitativa dos aromas dos óleos e seus resultados foram tratados por análise de correspondência. Os acessos de *Lippia alba* cultivados sob as mesmas condições, forneceram óleos essenciais de composição química bem variável em relação a compostos majoritários, tais como mirceno, citral, limoneno e linalol, o que caracteriza os quimiotipos característicos da espécie. Os resultados estatísticos revelaram que algumas amostras mostram similaridade entre si como L40 com L43 e L15, L 07 e L42. Por sua vez as amostras de *Lippia* comum (LC) e L 10 apresentaram um perfil diferente em relação às demais. A análise sensorial revelou que os aromas dos óleos dos acessos L07 e L10 apresentaram qualidade de tempero e floral. L15 e L43 puderam ser descritas pelos termos menta, verde, pimenta, terra e madeira. L42 apresentou características cítricas e medicinais. A *lippia* comum (LC) e L40 foram descritas pelos termos fresco, doce, frutal, balsâmico e casca de laranja. Esses resultados demonstram a riqueza e relevância desses óleos uma vez que grande parte dos compostos tidos como majoritários são de grande importância industrial.

Palavras-chave: *Lippia alba*, Óleo essencial, Compostos odoríferos

ABSTRACT

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown (erva-cidreira) (Verbenaceae) is a plant species that grows in the form of herb or shrub. There are records of their occurrence in countries of South and Central America, Europe and Africa. In Brazil rises in all regions as demonstrating relevance to the national survey. The *L. alba* oil arouses great interest for the flavor and fragrance industry, either through their mixture or their individual compounds, so that are necessary analyzes of oils of genotypic varieties of the species concerned. Various studies indicate a genetic variability in specie dividing into chemotypes, which determine different compositions for *L. alba*'s oil according to the major compounds. This study aimed to determine the volatile profile from the essential oils of new genotypes of *Lippia alba*, prospecting materials with potential for use in the flavor industry and investigate the occurrence of different chemotypes. They were obtained essential oils of *Lippia alba* common and six hits cultivated in the Garden of Medicinal Plants of Embrapa (L07, L10, L15, L40, L42 and L43) by hydrodistillation with a Clevenger apparatus. The volatile compounds were analyzed and quantified by gas chromatograph with flame ionization detector (GC-FID) using RTX-5 column. To identify compounds there were analyzes in a gas chromatograph coupled to mass spectrometer (GC-MS) using a DB-5 column. The area of the peaks of the chromatograms were analyzed by multivariate statistical techniques of hierarchic grouping (clusters) and Principal Compound Analysis (PCA). The sensory test CATA Check-all-that-apply was applied for qualitative characterization of aromas of the oils and the results were treated by correspondence analysis. The *Lippia alba* access cultivated under the same conditions, provided essential oils and variable chemical composition in respect of major compounds such as myrcene, citral, linalool and limonene, which features characteristic of the species chemotypes. The statistical results showed that some samples show similarity to each other as L40 to L43 and L15, L 07 and L42. The samples common *Lippia* (LC) and L 10 had a different profile in relation to others. Sensory analysis showed that the aromas of oils L07 and L10 accessions presented spice and floral quality. L15 and L43 could be described by the terms mint, green, pepper, earth and wood. L42 presented citrus and medicinal characteristics. The common *Lippia* (LC) and L40 were described by the terms fresh, sweet, fruity, balsamic and orange peel. These results demonstrate the richness and relevance of these oils since most of compounds considered as majority are of great industrial importance.

Keywords: *Lippia alba*, Essential oil, Odoriferous. compounds

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Compostos majoritários presentes em óleos essenciais de <i>Lippia alba</i>	20
Figura 2 – Estruturas básicas dos compostos monoterpênicos.	24
Figura 3 – Estruturas básicas dos compostos sesquiterpênicos.	25
Figura 4 – <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown (LC)	30
Figura 5 – Acessos de <i>Lippia alba</i> cultivados no Horto de Plantas Medicinais da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE).	31
Figura 6 – Sistema de Hidrodestilação com aparelho de Clevenger para extração de óleo essencial.	33
Figura 7 – Sistema montado para determinação da umidade do material vegetal.	33
Figura 8 – Cromatógrafo à gás com detector de ionização de chama (CG-DIC). Shimadzu GC-2010.	36
Figura 9 – Cromatógrafo à gás acoplado à espectrômetro de massas (CG-EM) Shimadzu QP-2010.	36
Figura 10 – Rendimentos dos óleos essenciais dos acessos de <i>L. alba</i>	38
Figura 11 – Cromatograma fornecido por análise em CG-DIC do óleo essencial da <i>Lippia alba</i> comum (LC).	40
Figura 12 – Cromatograma fornecido por análise em CG-DIC do óleo essencial do acesso L07 da coleção de <i>Lippia spp</i> da Embrapa.	40
Figura 13 – Cromatograma fornecido por análise em CG-DIC do óleo essencial do acesso L10 da coleção de <i>Lippia spp</i> da Embrapa.	41
Figura 14 – Cromatograma fornecido por análise em CG-DIC do óleo essencial do acesso L15 da coleção de <i>Lippia spp</i> da Embrapa.	41
Figura 15 – Cromatograma fornecido por análise em CG-DIC do óleo essencial do acesso L40 da coleção de <i>Lippia spp</i> da Embrapa.	42
Figura 16 – Cromatograma fornecido por análise em CG-DIC do óleo essencial do acesso L42 da coleção de <i>Lippia spp</i> da Embrapa.	43

Figura 17 – Cromatograma fornecido por análise em CG-DIC do óleo essencial do acesso L43 da coleção de <i>Lippia</i> spp da Embrapa.	43
Figura 18 – Área e número de compostos identificados nos acessos de <i>Lippia alba</i> por classes químicas majoritárias.....	44
Figura 19 – Análise de agrupamento Hierárquico (clusters dos compostos voláteis (concentração em mg/mL) detectados no óleo essencial de genótipos de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown do Banco de Germoplasma da Embrapa (DF), cultivadas no Horto de Plantas Medicinais.	51
Figura 20 – Análise de Componentes Principais dos compostos voláteis detectados no óleo essencial de genótipos de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown do Banco de Germoplasma da Embrapa (DF), cultivadas no Horto de Plantas Medicinais da Embrapa (CE).	51
Figura 21 – Gráfico simétrico gerado pela Análise de Correspondência dos dados do teste CATA para aroma dos óleos essenciais de <i>Lippia alba</i>	55

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Identificação e origem dos acessos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE), 2016..... 32
- Tabela 2** – Perfil dos compostos voláteis (concentração em mg/mL) detectados no óleo essencial de genótipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown do Banco de Germoplasma da Embrapa (DF), cultivadas no Horto de Plantas Medicinais da Embrapa (CE). 47
- Tabela 3** – Compostos voláteis majoritários do óleo essencial de genótipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown do Banco de Germoplasma da Embrapa (DF), cultivadas no Horto de Plantas Medicinais da Embrapa (CE). 49
- Tabela 4** – Autovalores e variabilidade acumulada nos Componentes Principais dos compostos voláteis de genótipos de *Lippia alba*. 53
- Tabela 5** – Frequência de julgadores que marcaram os descritores de odor no teste CheckAll-That-Apply (CATA) para aroma do óleo essencial de acessos de *Lippia alba*. 54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	17
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1	<i>Lippia Alba</i> (MILL.) N. E. BROWN.....	18
3.1.1.	Aspectos Botânicos e Agronômicos.....	18
3.1.2.	Composição Química.....	19
3.1.3.	Usos e Propriedades.....	21
3.2	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	22
3.3	ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS.....	25
3.3.1.	Isolamento de Compostos Voláteis.....	26
3.3.2.	Separação por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução.....	26
3.3.3.	Identificação de Compostos Voláteis.....	26
3.4	ANÁLISE SENSORIAL.....	27
3.5	MÉTODOS ESTATÍSTICOS MULTIVARIADOS.....	28
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1	DESCRIÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	30
4.2	EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	32
4.3	DETERMINAÇÃO DA UMIDADE DAS FOLHAS DE <i>L. alba</i>	33
4.4	SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS (FID).....	34
4.5	QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DOS ÓLEOS.....	34
4.6	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS.....	34
4.7	ANÁLISE SENSORIAL.....	37
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1	RENDIMENTOS DOS ÓLEOS DE <i>L. alba</i>	38
5.2	PERFIL E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE <i>L. alba</i>	38
5.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
5.3.1.	Análise de Cluster.....	49
5.3.2.	Análise de Componentes Principais.....	50

5.3.3. Análise Sensorial	53
6 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICE A	63

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias orgânicas voláteis naturais, geralmente odoríferas, produzidos por plantas aromáticas. São ricos em metabólitos secundários de variada composição em diferentes concentrações, dos quais predominam compostos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, fenóis, ésteres, cetonas, éteres e outros (SIMÕES, 2003; BAKKALI et al., 2008). Em geral, os óleos essenciais são utilizados como matéria-prima de produtos da indústria de alimentos, bebidas, fragrâncias, cosméticos e farmacêutica (BUSATTA, 2006; FIGUEIREDO et al., 2007). Além da sua composição aromática, muitos são importantes por suas valorosas e/ou múltiplas propriedades biológicas, como: atividade antifúngica, antibacteriana, inseticida, antioxidante, analgésica, sedativa, antiinflamatória, antiviral, anti-séptica e alelopática (HARBORNE, 1993; PRABUSEENIVASAN et al., 2006; BAKKALI et al.; 2008; AQUINO et al., 2010).

Várias espécies vegetais produzem óleos essenciais nas suas diversas partes (folhas, flores, cascas de frutos, cascas dos caules, resinas da casca, madeira, raízes, rizomas, frutos ou sementes), mais especificamente em estruturas especializadas como os pelos glandulares e bolsas secretoras (BOTTEGA; CORSI, 2000; SIMÕES; SPITZER, 2004). Estudos científicos confirmam a importância de diversas plantas aromáticas com potencial aplicação de seus óleos essenciais e uso de seus aromas em processos tecnológicos (SANTOS et al., 2004). Entre outras espécies promissoras encontra-se a *Lippia alba*, conhecida como erva-cidreira, cujo potencial industrial está associado às suas grandes facilidades agrônômicas como rusticidade, vigor, rapidez de colonização pela propagação vegetativa, plasticidade fenotípica e a variabilidade genética em relação à composição química do óleo essencial (YAMAMOTO, 2006).

O gênero *Lippia* (Verbenaceae) é composto por cerca de 250 espécies de plantas amplamente distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas da América, Ásia e África (OLIVEIRA et al., 2006). A espécie *Lippia alba* é originária do Chile (América do Sul) e ocorre em praticamente todas as regiões do Brasil (LORENZI; MATOS, 2002), sendo principalmente suas folhas empregadas na medicina popular brasileira para infusão ou decocção no tratamento de doenças gástricas, diarréicas, febre, asma, tosse e remédio tranqüilizante (MATOS, 1996; GAZOLA et al., 2004). O óleo essencial de suas folhas tem sido, ainda, reportado como um produto com ação antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiespasmódico e antiprotozoário (ALEA et al., 1997; SOARES, 2001; OLIVEIRA, 2000; PESSINI et al., 2003; SENA FILHO, 2006; AQUINO et al., 2010).

O óleo essencial das folhas da espécie *L. alba* apresenta variada composição, sugerindo a existência de sete quimiotipos majoritários, dentre os quais estão: citrallinalol- β -cariofileno, tagetenona, limoneno-carvona, mirceno, γ -terpineno, cânfora e estragol (HENNEBELLE et al., 2008). As variações na constituição química desse óleo podem ser atribuídas aos fatores ambientais como a influência do clima e solo, bem como a época de colheita das plantas (MATOS, 1996). No Nordeste do Brasil, foi verificada a ocorrência de quimiotipos diferentes da erva-cidreira, identificados a partir da análise dos constituintes químicos do seu óleo essencial (MATOS, 1996). Em outros locais também foi observada a presença de diferentes quimiotipos dessa espécie, como na Colômbia, onde já foram descritos os quimiotipos citral, limoneno e carvona (VERBEL et al., 2010; STASHENKO et al., 2004), na Argentina foram relatados óleos contendo 1,8-cineol (eucaliptol), limoneno e β -mirceno (RICCIARDI et al., 2000) e em Cuba Alea e colaboradores (1996) caracterizaram óleos com alto teor de carvona.

Dada a sua diversidade, as indústrias farmacêuticas e de aromas, vêm utilizando a erva-cidreira para obtenção de distintos compostos químicos. A carvona, um dos seus constituintes principais, é utilizada como matéria-prima na obtenção de produtos como: creme dental, anti-séptico bucal, pão, picles, condimentos e bebidas (ANTUNES, 2005). O limoneno é largamente empregado para odorizar cosméticos, sabonetes e na indústria de alimentos e remédios (JÚNIOR; PASTORE, 2007). O linalol tem se destacado pelo seu expressivo rendimento na planta e por sua ampla utilização nas indústrias de aromatizantes, cosméticos e perfumes (EHLERT, 2003).

Com a intensificação competitiva de diversos setores industriais para o uso de óleos essenciais, têm-se elevado nos últimos anos a importação desse produto, principalmente de países como a França, Estados Unidos, Paraguai, Argentina e Vietnã, em razão da qualidade, variabilidade e disponibilidade ao nível comercial de novas essências naturais.

Apesar de pesquisas mostrarem a elevada biodiversidade brasileira de plantas aromáticas e mais especificamente na região do Semi-Árido, onde mais de 500 espécies já foram identificadas como produtoras de essências, pouquíssimos trabalhos fitoquímicos envolvendo avaliação do potencial olfativo com a participação das indústrias de aromas e fragrâncias instaladas no país têm sido realizados. Este fato dificulta as chances de redução de importação, bem como a descoberta de novas essências tão demandadas pelas referidas empresas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil de compostos voláteis do óleo essencial de novos acessos de *Lippia alba*, introduzidos no Ceará, prospectando materiais com potencial para utilização na indústria de aromas.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil de compostos voláteis óleo essencial da *Lippia alba* comum e de novos acessos de *L. alba* procedentes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN);
- Identificar, entre os materiais analisados, diferentes quimiotipos;
- Caracterizar particularidades dos aromas dos quimiotipos identificados através de testes de percepção olfativa.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Lippia Alba* (MILL.) N. E. BROWN

3.1.1. Aspectos Botânicos e Agronômicos

A espécie *L. alba* (Mill.) N. E. Brown ex Briton & Wils, conhecida como ervacidreira, pertence ao Filo Magnoliophyta (Angiosperma); Classe Magnoliopsida (Dicotiledôneas); Sub-classe Asteridae; Ordem Lamiales; Família Verbenaceae; Gênero *Lippia*; Espécie *alba* (INBIO, 2015).

Pereira Pinto et al. (2000) descrevem *L. alba* como um subarbusto bianual medindo de um a dois metros de altura, bastante ramificado dicotomicamente; caule herbáceo de cor castanho claro, folhas de cor verde claro a escuro, nervadas, oblongoagudas, opostas, abertas, possuem cheiro forte aromático. Das folhas exala um cheiro característico, flores rósea-violácea; raízes fasciculadas.

Já Lorenzi e Matos (2002) a caracterizam como subarbusto de morfologia variável, alcançando até um metro e meio de altura, raramente dois metros. As folhas são inteiras, opostas, de bordos serrados e ápice agudo, de 3-6 cm de comprimento. Flores azul-arroxeadas, reunidas em inflorescências axilares capituliformes de eixo curto e tamanho variável. Os frutos são drupas globosas de cor róseo-arroxeadas. O sistema de ramos é homomórfico, não se observa especialização em ramos férteis e vegetativos (PARRA-GARCÈS et al., 2010). Nos novos ramos que se originam a partir de gomos prolépticos, as florescências se desenvolvem silepticamente em seu conjunto formam as inflorescências (MÚLGURA DE ROMERO et al., 1998) e cada uma das flores que a formam produzem néctar e pólen durante todo o ano (VIT et al., 2002).

A espécie *Lippia alba* pode ser encontrada em climas quente úmido, quente seco e temperado. Desenvolve em regiões sem excesso de calor ou frio, com temperaturas de até 32°C com alta intensidade luminosa (PARRA-GARCÈS et al., 2010). Devido a sua rusticidade responde a diversos tipos de solo como argilosos e limosos com pH de 5 a 6 (GUZMÁN et al., 2004). No Brasil está presente nos seguintes domínios fitogeográficos Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (SALIMENA; MULGURA, 2015).

3.1.2. Composição Química

Algumas vantagens da *L. alba* inclui a propagação vegetativa (BIASE; COSTA, 2003) e a simplicidade dos métodos usados para isolamento do óleo essencial. Segundo Yamamoto (2006), dentro da espécie existe variabilidade genética em relação à composição química do óleo essencial.

Quimiotipos de espécies de microorganismos ou de vegetais são tradicionalmente definidas como fenótipo químico, baseados em perfil de produtos naturais, e genótipo é definido como sua constituição genética ou sequência de DNA. A divisão de grupos de organismos em quimiotipos, a qual é baseada no princípio que perfis químicos e outras características não morfológicas são expressões do genoma (DESJARDINS, 2008).

Hennebelle e colaboradores (2008) citaram a ocorrência de sete tipos químicos (quimiotipos) na espécie da erva-cidreira, cuja variabilidade foi identificada a partir da análise dos constituintes químicos majoritários do óleo essencial e rotas metabólicas.

Grandes variações têm sido observadas na composição dos extratos do óleo essencial de *L. alba*, dependendo da parte da planta empregada na destilação, o estágio de desenvolvimento, a localização geográfica e características de solo, clima, e outras condições locais (ALEA et al., 1997; STASHENKO et al., 2003).

Os estímulos decorrentes do ambiente, no qual a planta se encontra, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos (BEZERRA et al., 2008). A composição do óleo essencial de *L. alba* apresenta variação quantitativa e qualitativa, levando à separação em quimiotipos (MATOS, 1996; FRIGHETO et al., 1998; ZOGHBI et al., 1998), os quais poderiam apresentar atividades farmacológicas distintas, bem como diferenças morfológicas (MATOS, 1996; CORREA, 1992).

As variações na composição do óleo essencial e características morfológicas têm sido observadas dependendo também da origem geográfica do material, o que levou a hipótese de que seriam consequência da influência de fatores ambientais (RETAMAR, 1994; ZOGHBI et al., 1998).

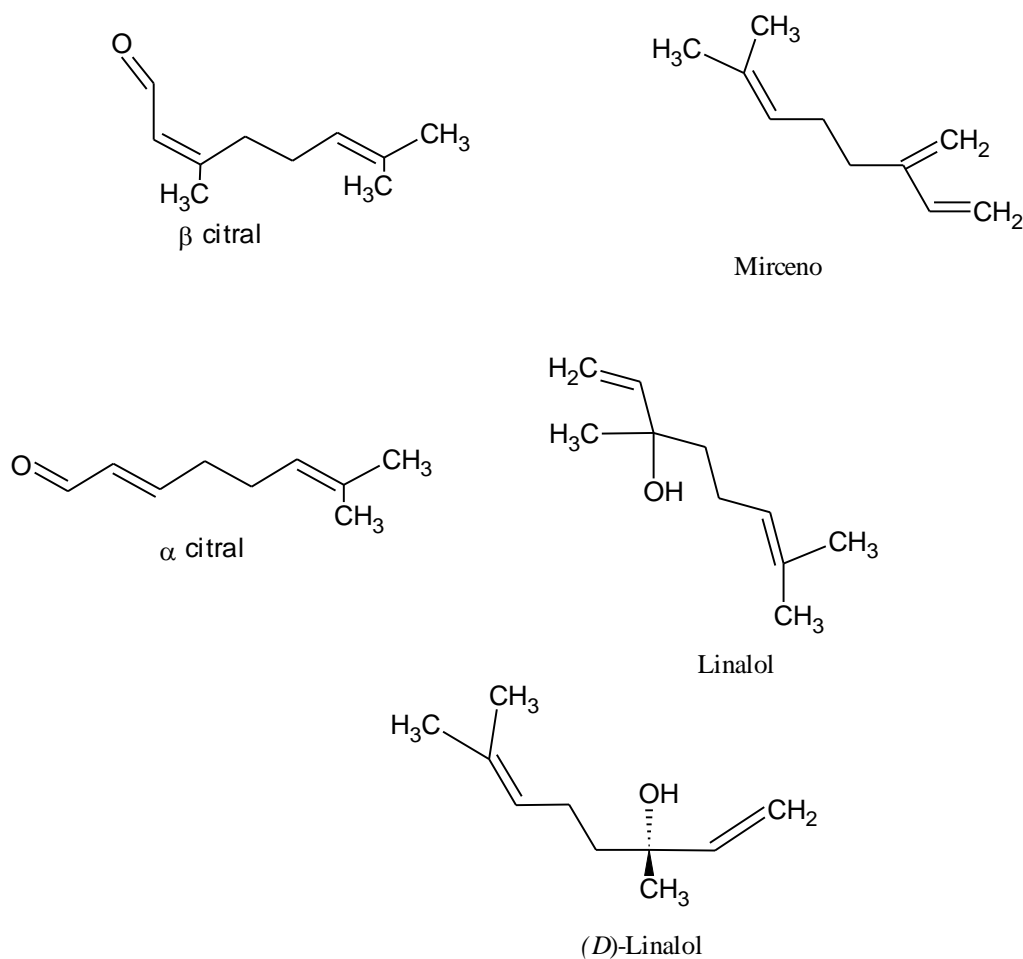
Matos (1996) verificou a ocorrência de quimiotipos diferentes da espécie *Lippia alba* presente no Nordeste brasileiro, cuja variabilidade foi identificada a partir da análise dos constituintes químicos do óleo essencial. Os quimiotipos receberam as designações de acordo com os constituintes majoritários encontrados: mirceno-citral (quimiotipo I), limoneno-citral (quimiotipo II) e limoneno-carvona (quimiotipo III).

Hennebelle e colaboradores (2006) basearam-se em estudos anteriores da análise de seus óleos e classificaram-nos com base na composição. Para o quimiotipo I tem-se citral, linalol, β -cariofileno, como principais constituintes; para o quimiotipo II não houveram compostos alvo; o quimiotipo III apresenta comumente limoneno acompanhado de carvona com variações biosintéticas como cetonas monoterpênicas (diidrocarvona, piperitona, piperitenona). Foram descritos ainda o quimiotipo IV (mirceno), o V (γ -terpineno), VI (canfora-1,8-cineol) e VII (estragol).

Alguns quimiotipos rendem uma forma dextrógena do linalol, o qual é o principal composto do óleo essencial usado na indústria, com quase 100% de pureza (SIANI et al., 2002).

A figura 1 apresenta os principais constituintes majoritários presentes em óleos essenciais de *L. alba*.

Figura 1 – Compostos majoritários presentes em óleos essenciais de *Lippia alba*.



3.1.3. Usos e Propriedades

A erva-cidreira *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown é uma das plantas de real importância farmacológica, sendo utilizada em diversos programas de fitoterapia. A espécie é largamente utilizada no Brasil devido às suas propriedades calmante, espasmolítica suave, analgésica, sedativa, ansiolítica e levemente expectorante (MATOS et al., 1996).

Segundo Rossato e colaboradores. (2006), o óleo essencial de *L. alba* demonstra potencial antioxidante semelhante ao efeito da vitamina E. *Lippia alba*, também conhecida como “salvia de Castilla”, está incluída como uma das 163 espécies vegetais relatadas por 83 informantes a ser usada no tratamento do “empacho”, uma grave indigestão seguida por diarreia (SCARPA, 2004).

No Brasil, a planta é usada no tratamento de doenças hepáticas (DI STASI et al., 1994) e no México é usado no tratamento de inflamação da vesícula biliar (ZAMORAMARTÍNEZ; NIETO DE PASCUAL, 1992). As folhas são empregadas como uma infusão ou decocção para o tratamento de doenças gástricas, diarreia, febre, asma e tosse e como um remédio tranquilizante (MATOS et al., 1996; TAVARES et al., 2005).

As folhas são utilizadas pela população na forma de infuso, tintura, banhos, cataplasmas e inalação. Sua aplicação inclui tratamento de distúrbios gastrointestinais, doenças respiratórias (pela atividade antibacteriana), problemas hepáticos e gastrite (PASCUAL et al., 2001), e intoxicações em geral.

Diferentes atividades biológicas como citotóxicas, antifúngicas, antibacterianas, antivirais e anti-inflamatórias, têm sido identificadas em óleos essenciais ou extratos de *L. alba* (VIANA et al., 1998; HOLETZ et al., 2002; COSTA et al., 2004; ANDRIGHETTIFROHNER et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006).

Oliveira et al. (2006) relataram a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *L. alba* contra fungos patogênicos humanos como *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida neoformans*, *Trichophyton rubrum* e *Fonsecaea pedrosoi* dos quimiotipos citral e mircenocitral. Estudos etnofarmacológicos apontam *L. alba* como sedativo, antidepressivo e detentora de propriedades analgésicas (HENNEBELLE et al., 2008).

O óleo essencial de *L. alba* também tem muitas aplicações, tais como antiácido, antidigestivo, anti-hemorroida e antiasmáticos (HENNEBELLE et al., 2008).

O limoneno é utilizado industrialmente como solvente para produtos à base de óleo e resina, aromatizante em produtos de limpeza, alimentícios e cosméticos.

A carvona possui efeito espasmolítico por isso é usada em formulações farmacêuticas como carminativa e para combater males estomacais, usada também em produtos cosméticos. Em

alguns estudos foi demonstrada sua atividade bactericida e fungicida. É utilizada nas indústrias de alimentos, perfumes e farmacêutica. Os enantiômeros são diferentes quanto ao odor e gosto por isso divergem também quanto aos usos. O enantiômero (*R*)-carvona possui odor de menta e frequentemente é adicionado a pastas de dentes, antissépticos bucais e gomas de mascar, já (*S*)-carvona possui sabor típico é usado como intensificador de sabor na indústria alimentícia e de fragrâncias. Combinações de óleos essenciais com ambos enantiômeros são aplicados em aromaterapia, tratamentos de massagens para tensão nervosa e várias doenças de pele, pois aplicações tópicas dos enantiômeros, separadamente ou não são rapidamente absorvidos (OPDYKE, 1979; KARR et al., 1990; BADIES, 1992; JÄGER et al., 2001).

O linalol tem se destacado pelo seu expressivo rendimento na planta, por sua ampla utilização nas indústrias de aromatizantes, cosméticos e perfumes e pelas suas propriedades inseticidas, antiinflamatórias e antissépticas. Puro possui um odor fresco, suave e floral com uma ligeira impressão de cítrico é utilizado em grandes quantidades em produtos como sabão e detergente. Sua atividade psicofarmacológica em ratos, foi avaliada recentemente revelando efeitos sedativos da dose marcada dependentes do sistema nervoso central (SNC) (JIROVETZ et al., 1991; WICHTEL, 2002; EHLERT, 2003; SIMÕES; SPITZER, 2003).

Mirceno é usado na fabricação de bebidas alcoólicas. Também é frequentemente usado em muitas preparações farmacêuticas como um sedativo suave para o tratamento da insônia (WICHTEL, 2002). Seu odor caracteriza-se como picante ou apimentado (THEGOODSCENTS, 2016).

Henderson e colaboradores (1998) sugerem a investigação do citral como agente quimiopreventivo para tratamento da carcinogênese relacionada ao câncer de pele. Mulder e colaboradores (1995) citam sua eficácia frente ao câncer de cólon. Suas formas isômeras apresentam odor descrito como cítrico, e encontram uso nas indústrias de cosméticos e perfumes (THEGOODSCENTS, 2016).

3.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Segundo a International Standard Organization (ISO), óleos voláteis são produtos do metabolismo das plantas obtidos de partes do vegetal através de destilação por arraste com vapor d'água. Geralmente apresentam em sua composição, predominantemente, uma mistura de terpenos, os monoterpenos e sesquiterpenos, classificados de acordo com sua estrutura química.

Estão localizados em diferentes partes da planta. podendo ser encontrados em raízes, tais como no caso da grama vetiver (*Vetiveria zizanioides*), em hastes como ocorre com a madeira

petiribi (*Cordia trichotoma*), em folhas como em árvores de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*), citronela (*Cymbopogon nardus*), cravo-de-defunto (*Tagetes minuta*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*), em flores como alfazemas (*Lavandula officinalis*), em frutas como limão, laranja (*Citrus* spp.) e até mesmo em sementes como no caso de anis (*Pimpinella Anisum*), coentro (*Coriandrum sativum*) e pimenta (*Piper nigrum*), entre outros (BASER; BUCHBAUER, 2010).

Os óleos essenciais são produtos naturais que as plantas produzem para suas próprias necessidades dentre outras para sua nutrição.

Para Harrewijn e colaboradores (2001) substâncias voláteis de plantas podem trabalhar na defesa destinada a inimigos naturais, mas também para atrair insetos polinizadores ao seu hospedeiro.

Em geral, os óleos essenciais são misturas complexas de compostos orgânicos que conferem odor e sabor característicos às plantas. São formados principalmente por monoterpenos e sesquiterpenos cuja via metabólica principal é através do mevalonato (CHAMORRO et al, 2012).

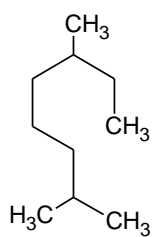
Possuem diversas propriedades biológicas devido à presença dessas misturas de voláteis principalmente mono e sesquiterpenos, compostos benzenóides, fenilpropanóides e outros.

Terpenos constituem a maior classe de metabólitos secundários no reino vegetal, formada pela fusão de unidades de isopreno (C5), terpenos são classificadas pelo número de unidades em seu esqueleto básico. A ligação entre duas unidades de isopreno forma os monoterpenos.

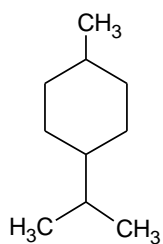
A Figura 2 mostra os esqueletos monoterpenicos comumente encontrados nos óleos essenciais as principais estruturas são: *p*- mentano, tujano, pinano, carano, fenchano, bornano, triciclano, todos cíclicos e um único acíclico. Já os sesquiterpenos mais comuns tem suas estruturas exibidas na figura 3 as quais são: humulano, bisabolano, elemano, germacrano, cariofilano, eudesmano, cadinano, eremofilano, guaiano, maalieno e aromandreno (MORAIS; BRAZ FILHO 2007).

A composição de OE de algumas espécies de plantas podem diferir entre as estações de colheita e entre as fontes geográficas (ARRAS;GRELLA,1992; MAROTTI et al., 1994,MCGIMPSEY et al., 1994, COSENTINO et al., 1999, MARINO et al., 1999, JULIANO et al., 2000 ; FALEIRO et al., 2002).

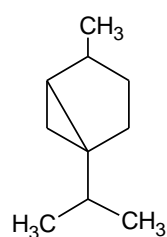
Em geral, têm um cheiro agradável, por isso são amplamente utilizados em diversas indústrias, especialmente em perfumes (fragrâncias e loções), produtos alimentares (como aromatizantes e conservantes) e produtos farmacêuticos (devido sua ação terapêutica) (ZYGADLO; GIULIANI, 2000).

Figura 2 – Estruturas básicas dos compostos monoterpênicos.

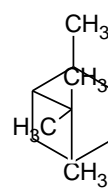
Acíclico



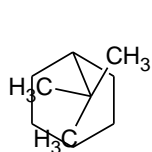
p Metano



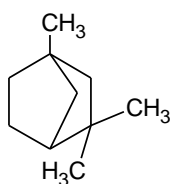
Tujano



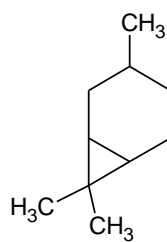
Pinano



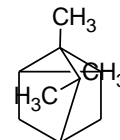
Bornano



Fenchano

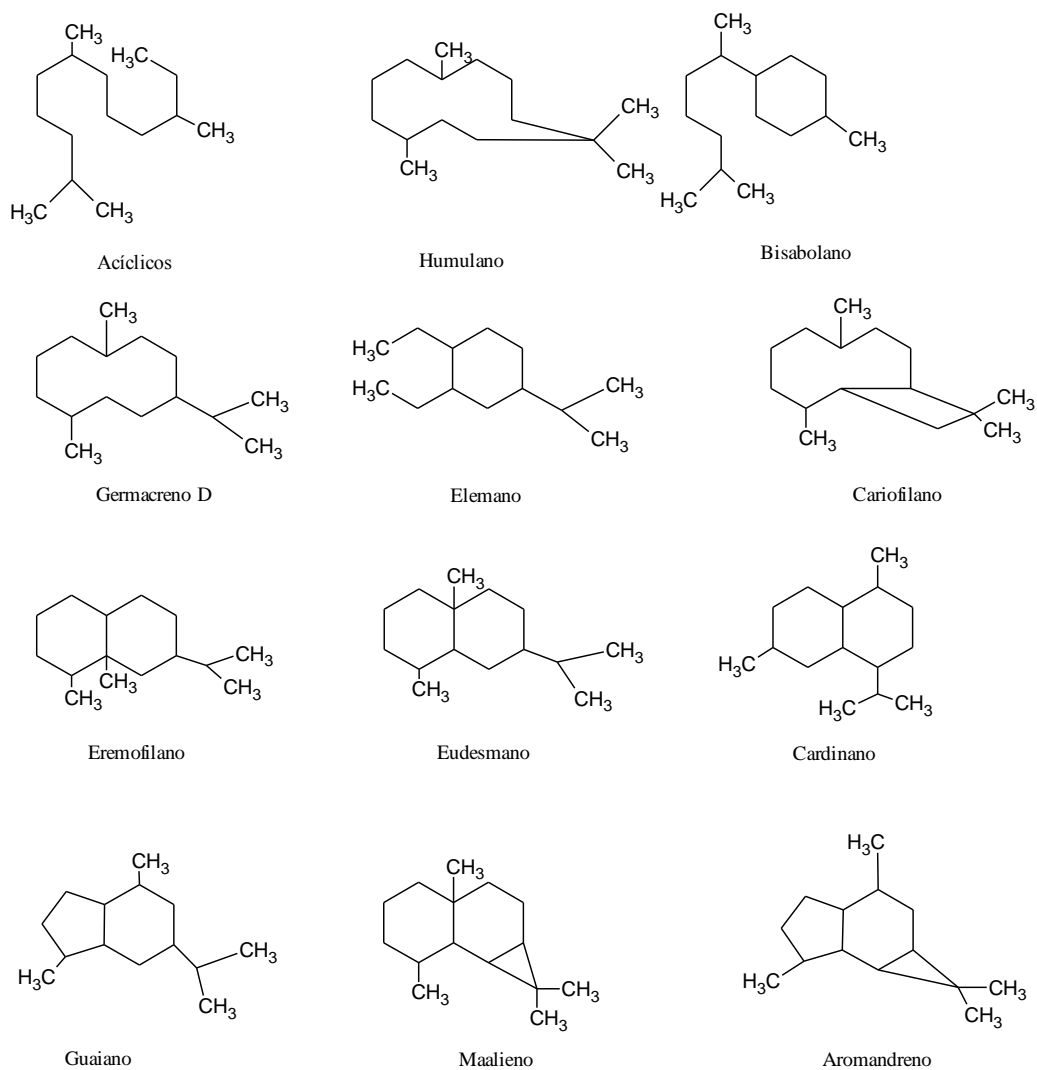


Carano



Triciclano

Figura 3 – Estruturas básicas dos compostos sesquiterpênicos.



3.3 ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

O aroma é devido a dezenas ou centenas de substâncias voláteis, representantes de várias classes químicas, com diferentes propriedades físico-químicas. O sabor característico é conferido aos alimentos pelos compostos voláteis. O sabor é principalmente uma resposta integrada às sensações do gosto e do aroma. O gosto é atribuído aos compostos não voláteis presentes nos alimentos (FRANCO, 2003)

A pesquisa envolvendo aromas e conseqüentemente compostos voláteis mostra sua complexidade, pois essas substâncias demonstram propriedades químicas divergentes, estão presentes em quantidades extremamente reduzidas e ainda são sensíveis a aumentos de temperatura podendo sofrer reações químicas, rearranjos, hidrólise dentre outros o que compromete a integridade inicial da amostra.

O estudo de voláteis compreende quatro etapas: o isolamento dos compostos voláteis, a separação por cromatografia gasosa de alta resolução, a análise sensorial e a identificação de compostos voláteis.

3.3.1. Isolamento de Compostos Voláteis

A etapa inicial de isolamento de voláteis é de grande importância, pois garante sua ocorrência em concentrações detectáveis e elimina interferentes para uma posterior análise instrumental. Essa etapa pode ser feita por meio da Análise Total, onde se consideram todos os compostos voláteis presentes na amostra ou ainda por Análise do *Headspace*, envolvendo apenas a fase gasosa em equilíbrio com a fase líquida ou sólida da amostra.

3.3.2. Separação por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução

Após o isolamento se obtêm uma mistura completa de voláteis que para serem devidamente identificados devem ser separados por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução.

As colunas capilares de sílica fundida oferecem alta resolução e eficiência. Tais colunas são praticamente inertes, altamente flexíveis, facilitando a instalação nos instrumentos. Além disso, as fases estacionárias podem ser quimicamente ligadas às paredes da coluna, apresentando baixa volatilidade, estabilidade térmica e inatividade química, portanto, apresentam menor sangramento e maior tempo de vida útil (FRANCO, 2003).

Os injetores para cromatografia gasosa, usualmente são dos tipos *split-splitless*, *on-column* e *programmed temperature vaporizer* (PTV). Os dois últimos injetores, além do tipo *split-splitless* usado na forma *splitless*, são os indicados para análise de traços, geralmente envolvendo efeitos de focalização da amostra na entrada da coluna capilar (GROB, 1994).

3.3.3. Identificação de Compostos Voláteis

A combinação de cromatógrafos à gás aos espectrômetros de massa possibilitou que identificação de compostos voláteis fosse realizada de maneira bastante confiável. Essas duas técnicas analíticas aliadas representam um avanço imprescindível na separação e identificação de compostos voláteis.

Com o desenvolvimento dos sistemas de análise de dados por computadores os cromatogramas e os espectros de massa podem ser armazenados para pós-processamento. A incorporação de programas específicos habilita o computador a rastrear e ajustar as condições instrumentais ótimas durante toda a análise cromatográfica facilita os cálculos, processa os dados experimentais e os confronta com os dados da biblioteca inserida no sistema, informando rapidamente os possíveis resultados com certo grau de certeza (FRANCO, 2003).

Apenas os dados de cromatografia gasosa-espectrometria de massas são insatisfatórios para uma identificação positiva do composto. Embora permita uma identificação tentativa, em alguns casos, informações adicionais obtidas por espectrometria no infravermelho, ressonância magnética nuclear e de padrões puros ainda são necessárias (JOULAIN, 1994).

Para uma identificação correta ainda tem-se que considerar características relativas aos tempos de retenção dos compostos, sobretudo quando estes apresentam espectros de massa semelhantes.

Um índice de retenção sistemático, proposto por Kovats, permite expressar o tempo de retenção dos compostos de interesse em uma escala uniforme, construída a partir de padrões de alcanos em isotermas definidas para uma determinada fase estacionária (ETTRE, 1964).

Os índices de retenção têm auxiliado na identificação dos compostos, comparando a ordem de eluição experimental com a ordem de eluição indicada na literatura (FRANCO, 2003; LANÇAS, 2000).

3.4 ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial é utilizada para evocar, medir, analisar e interpretar reações às características de alimentos e outros materiais da forma como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição (MINIM, 2006)

É de fundamental importância identificar as propriedades de interesse em relação a qualidade sensorial do produto em análise, fazer a escolha do método sensorial adequado para qualificar e ou quantificar a sensação experimentada pelo provador como resposta ao estímulo provocado pelo produto estabelecendo assim as condições ambientais do teste e selecionando a equipe de julgadores, aplicar métodos estatísticos adequados para tratar os resultados.

A ciência que envolve técnicas sensoriais encontra importantes aplicações na indústria e estabelecimentos de pesquisa. Participa ativamente das fases de desenvolvimento de novos

produtos como na Análise descritiva de amostras experimentais, classificação das amostras baseada em padrões estabelecidos e garante que um dos produtos experimentais tenha aceitabilidade igual ou superior ao padrão. Encontra uso também no setor de controle de qualidade, tanto no que diz respeito ao processo de fabricação, controlando matérias-primas e variações no processamento, quanto ao produto final, monitorando possíveis perdas na qualidade do produto devido ao armazenamento. Bastante relevante também em estudos de mercado comparativos e de aceitação entre o produto da empresa e o da concorrente. Na pesquisa, direciona métodos instrumentais que tenham correlação com atributos sensoriais.

De nada vale para o consumidor um produto que possua excelentes características químicas, físicas ou microbiológicas, que seja considerado de excelente qualidade, se a característica sensorial desse produto não preencher as necessidades e os anseios de quem o consumirá.

A técnica sensorial Check-all-that-apply (CATA) tem relação com a percepção dos consumidores quanto a atributos de produtos que tem sido usados em estudos de consumo para determinar quais os atributos sensoriais podem caracterizar um produto específico (LANCASTER; FOLEY, 2007). No CATA listas são oferecidas para descrever o produto em teste. Esse procedimento permite que os consumidores confrontem todos os atributos potenciais para descrição e ainda podem estar relacionados ao uso do produto ou conceito em forma.

3.5 MÉTODOS ESTATÍSTICOS MULTIVARIADOS

Os métodos estatísticos descritos na literatura científica envolvem em sua maioria uma análise univariada dos dados, em que se considera apenas uma variável aleatória. Em contrapartida os métodos multivariados nos permitem analisar variáveis diversas simultaneamente, além disso, facilita a obtenção de resultados relevantes provenientes de um elevado número de dados químicos, caracterizando a quimiometria e ainda maximiza respostas dos mesmos.

Em quimiometria usualmente fazem-se uso de algumas técnicas estatísticas como: Análise dos Componentes Principais (ACP), Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA- sigla em inglês), Análise de Escalamento Multidimensional (MDS- sigla em inglês), Análise Discriminante Linear (LDA- sigla em inglês) e Análise de Correlação Canônica (CCA- sigla em inglês) (REINECCIUS, 2006).

Análise de Componentes Principais (ACP), técnica empregada para análise de dados visando obter aqueles mais representativos a partir de combinações lineares das variáveis originais. A ACP objetiva encontrar combinações entre p variáveis X_1, X_2, \dots, X_p para produzir índices Z_1, Z_2, \dots, Z_p não correlacionados na ordem de sua importância e que descrevam a variação nos dados. Os índices Z são os componentes principais e para essa análise é necessário que suas variâncias sejam desprezíveis. Para obtenção de melhores resultados as variáveis originais devem ser altamente correlacionadas positivamente ou negativamente para que possam ser adequadamente representadas.

Em análise de agrupamentos temos uma amostra de n objetos que podem ser de natureza física ou abstrata, onde cada um tem um escore contendo p variáveis. A partir de seus valores monta-se um esquema para agrupar os objetos semelhantes em classes. Trata-se de um método numérico e o número de classes é desconhecido o que dificulta um pouco a análise. Por outro lado o método de agrupamentos mostra-se bastante útil para a definição dos grupos que realmente existem e para redução de dados.

As técnicas de agrupamento podem envolver hierarquia com a elaboração de dendrograma. Em Agrupamento Hierárquico (análise de clusters) objetos são agrupados em classes de objetos similares, suas distâncias são calculadas dando origem a uma matriz de distâncias. Todos os objetos começam sozinhos em grupos de tamanho um, os mais próximos se unem, então grupos são formados por um processo de aglomeração ou divisão, sendo o primeiro mais comum.

A Análise de Correspondência é um método estatístico multivariado de ordenação, sendo originado do trabalhos de Hirschfeld, Fisher e de uma escola de estatísticos franceses (BENZECRI, 1992). Ele é hoje o mais popular método de ordenação para ecologistas de plantas e está sendo usado em outras áreas também. Ela trata dados de abundância de cada uma das várias características de cada amostra. O propósito da análise de correspondência é de tornar claro o relacionamento entre os objetos, expressos por distribuição das características, e o relacionamento entre as características, expressos por distribuição dos objetos (MANLY, 2008).

No caso da análise sensorial, o método estatístico de análise de correspondência é utilizado para visualizar o relacionamento entre diferentes amostras, expresso pela distribuição da frequência da presença dos atributos sensoriais, que podem ser todos os descritores que descrevem aquele produto, ou apenas aqueles de interesse, como por exemplo, descritores de aroma.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESCRIÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Foram utilizados seis acessos de *L. alba*, (L07; L10; L15; L40; L42 e L43) procedentes da coleção de *Lippia* spp da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) unidade situada em Brasília- DF e um acesso de *Lippia alba* local (LC) cultivados no horto de plantas medicinais da Embrapa Agroindústria Tropical situado no município de Fortaleza, Ceará. Todos os acessos apresentam hábito de crescimento ereto prostrado. A coleta foi conduzida no período de abril a maio de 2015 durante o turno da manhã. Os arbustos foram podados, o corte das plantas foi feito a 10 cm da altura do solo. Suas folhas foram beneficiadas para posterior uso na extração dos óleos. As excicatas correspondentes aos acessos encontram-se depositadas no Herbário da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-DF.

Figura 4 – *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (LC)



Figura 5 – Acessos de *Lippia alba* cultivados no Horto de Plantas Medicinais da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE).

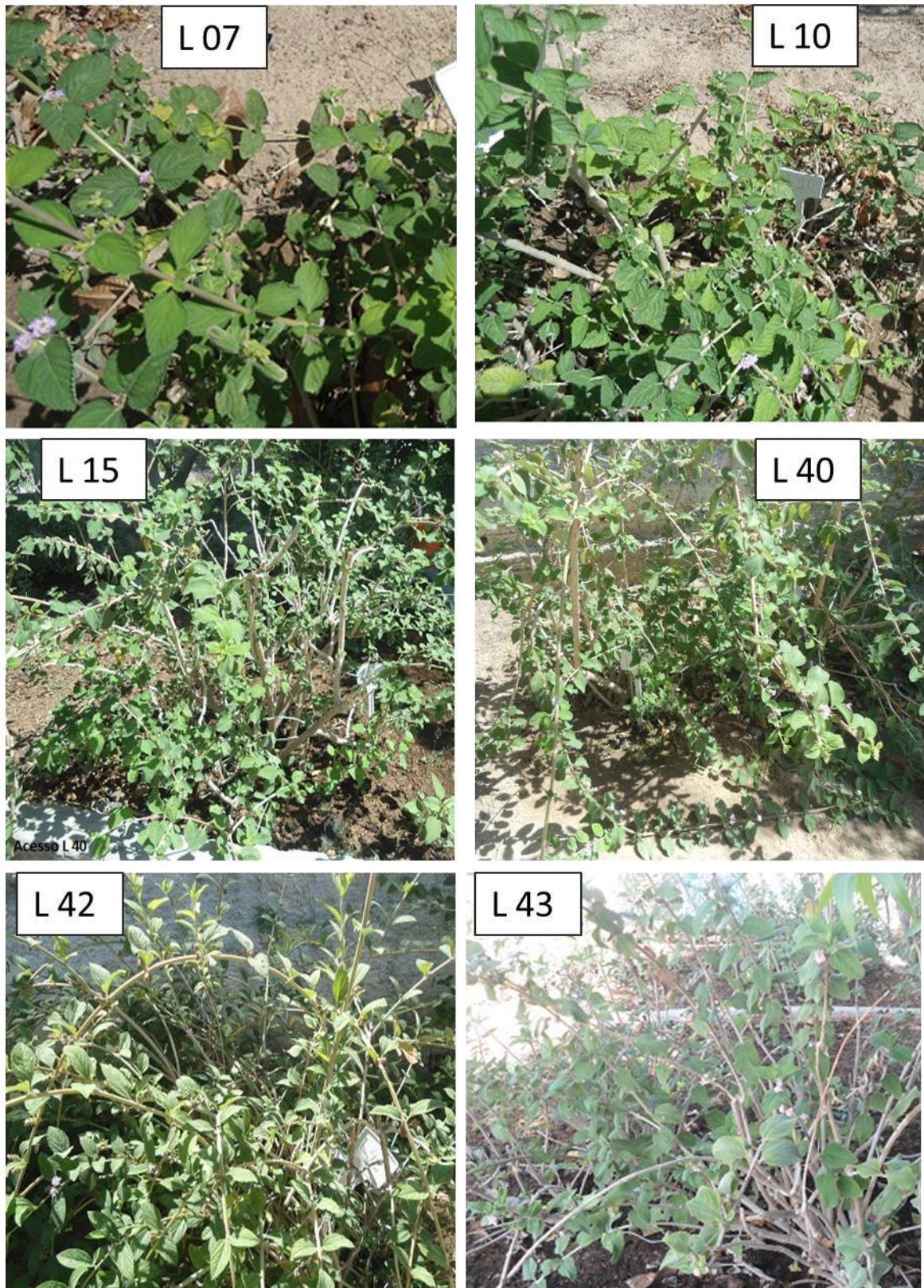


Tabela 1 – Identificação e origem dos acessos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE), 2016.

Acessos*	Localidade	Estado
L 07	Brazilândia II	DF
L 10	Cruzeiro/Grande	DF
L 15	Embrapa/Cenargen	DF
L 40	Uberlândia	MG
L 42	Fazenda Água Limpa da UNB	DF
L 43	Curitiba	PR
L comum (LC)	Horto de Plantas Medicinais da UFC	CE

*L = *Lippia alba*

4.2 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A extração dos óleos essenciais a partir das folhas de *L. alba* foi realizada no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais da referida unidade da Embrapa. As folhas dos acessos foram submetidas ao processo de hidrodestilação com aparelho de Clevenger (MATOS, 1996) por um período de 4 horas (Figura 6). O óleo obtido foi então devidamente tratado com sulfato de sódio anidro para eliminação de qualquer traço de água. O rendimento foi calculado a partir da equação em base úmida (BU) e em base livre de umidade (BLU), segundo as equações 1 e 2, respectivamente:

$$\eta_{BU} (\%) = \frac{VOE \text{ obtido}}{\text{massa inicial das folhas}} \times 100 \quad (1)$$

$$\eta_{BLU} (\%) = \frac{VOE \text{ obtido}}{\text{massa inicial das folhas} \times (1 - \text{Umidade})} \times 100 \quad (2)$$

Figura 6 – Sistema de Hidrodestilação com aparelho de Clevenger para extração de óleo essencial



4.3 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE DAS FOLHAS DE *L. alba*

Uma massa de 5 g de folhas dos acessos foi posta em contato com ciclohexano em um balão de 250 mL, que foi acoplado a um sistema composto de aparelho Dean Stark (Figura 7) também contendo certo volume do solvente. O sistema foi aquecido em manta aquecedora durante três horas. O volume de água medido foi anotado para posterior cálculo do teor de umidade, que foi determinado segundo a equação 3:

$$Umidade (\%) = \frac{Volume\ de\ água\ no\ Dean\ Stark\ (mL)}{Massa\ da\ amostra\ (g)} \times 100 \quad (3)$$

Figura 7 – Sistema montado para determinação da umidade do material vegetal.



4.4 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS (FID)

Os compostos voláteis dos óleos essenciais dos acessos de *Lippia alba* foram analisados em um cromatógrafo à gás com detector de ionização de chama (CG-DIC) Shimadzu GC-2010 (Figura 8) coluna capilar RTX-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), modo de injeção com divisão de fluxo de 1:50, durante toda a corrida, o gás carreador utilizado foi o nitrogênio com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, temperatura do injetor 250 °C, temperatura do detector de ionização de chama (FID) foi de 260°C. Programação do forno cromatográfico: temperatura inicial 70 °C, rampa de aquecimento de 4°C min⁻¹ até 180°C e de 8°C min⁻¹ até 250 °C. As análises foram realizadas em duplicata.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DOS ÓLEOS

Para quantificar os compostos detectados, às soluções com concentração de 1:100 dos óleos em hexano foram adicionados 10 ppm em relação ao padrão interno (PI) escolhido com base nos índices de retenção (Kovats), o PI usado foi o *p*-xileno. As análises foram realizadas em CG-DIC Shimadzu GC-2010 Plus em condições semelhantes às das injeções realizadas para a separação dos voláteis. A partir da concentração conhecida do PI e das áreas fornecidas pelos cromatogramas foram determinadas as concentrações em mg/ml a partir da equação 4.

$$[]_x = 0,001x \left\{ 0,001x100x \left[(100)x \frac{[]'_x}{[]'PI} \right] \right\}$$

[]_x = Média das Concentrações do composto x em mg/mL

[]'_x = Média das Concentrações do composto x na alíquota em ppm

[]'PI = Concentração do padrão interno em ppm

4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS

Para a identificação dos compostos voláteis foram realizadas análises em cromatógrafo à gás acoplado à espectrômetro de massas (CG-EM), em um instrumento Shimadzu QP-2010 (Figura 9), com impacto de elétrons a 70 eV, coluna capilar DB-5MS 5% fenil, 95% polidimetilsiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), gás carreador utilizado foi o hélio com fluxo de

1,0 mL.min⁻¹, temperatura do injetor 250 °C, temperatura da linha de transferência e da fonte de íons, 260°C. As demais condições foram semelhantes aos das injeções em CG-DIC. A identificação dos compostos foi realizada pela análise dos padrões de fragmentação exibidos nos espectros de massas, confirmada por comparação, dos seus espectros de massas, com aqueles presentes na base de dados fornecida pelo equipamento (NIST02), bem como através da comparação dos seus índices de retenção, calculados pela equação 5, com os de compostos conhecidos, obtidos por injeção de uma mistura de padrões contendo uma série homóloga de alcanos C9-C21, além de dados da literatura do National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA).

$$IK_x = 100(NA) + \frac{100(NP-NA)(\log(T'_x) - \log(T'_A))}{\log(T'_P) - \log(T'_A)} \quad (5)$$

Onde:

IK_x= Índice de Kovats do composto x;

NA= Número de carbonos do hidrocarboneto anterior (que elui antes de x);

NP= Número de carbonos do hidrocarboneto posterior (que elui depois de x);

T'_x= Tempo de retenção ajustado do composto x;

T'_A= Tempo de retenção ajustado do hidrocarboneto anterior;

T'_P= Tempo de retenção ajustado do hidrocarboneto posterior.

Figura 8 – Cromatógrafo à gás com detector de ionização de chama (CG-DIC). Shimadzu GC-2010.



Figura 9 – Cromatógrafo à gás acoplado à espectrômetro de massas (CG-EM) Shimadzu QP-2010.



4.7 ANÁLISE SENSORIAL

Soluções diluídas das amostras na proporção de 1:100 em hexano foram utilizadas para teste de percepção olfativa. Os descritores aromáticos dos óleos essenciais foram avaliados pelo método de Check- all -that apply (CATA). Para tanto, as amostras foram colocadas numa taça, coberta com um vidro de relógio e dispostas bandejas, as quais foram organizadas em salas separadas para não haver interferência na percepção de seus aromas. Uma amostra de café em pó foi servida para limpeza do olfato.

Um total de 35 julgadores foram convidados a verificar todos os odores percebidos e que pudessem descrever aroma de cada amostra. Foi montada uma lista de termos pré-escolhido, com base nas notas aromáticas descritas na literatura para cada um dos voláteis identificados previamente na análise de CG-EM. Os termos considerados na questão CATA foram os seguintes: verde, madeira, cítrico, fresco, balsâmico, plástico, terra, melão, cogumelo, pimenta, medicinal, casca de laranja, floral, doce, menta, tempero e frutal. Para análise dos dados, foi constituído pelo número de juízes que classificaram cada termo para cada amostra. Os descritores listados com frequência eram mais relevantes do que aqueles com menos frequência listados. Os dados foram analisados pelo teste de estatística multivariada Análise de Correspondência utilizando o software XLSTAT (Versão 1.02).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os compostos voláteis da *Lippia alba* comum e dos seis acessos do BAG da Embrapa foram analisados pelas técnicas de Agrupamento Hierárquico (análise de clusters), em que objetos físicos ou abstratos são agrupados em classes de objetos similares e multivariada de Análise de Componentes Principais (ACP), para análise dos dados visando obter os dados mais representativos a partir de combinações lineares das variáveis originais ambas com utilização do programa estatístico XLSTAT-MX Excel software (versão 2011.4.01).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTOS DOS ÓLEOS DE *L. alba*

Na Tabela 2 estão reunidos os resultados do teor de umidade e dos rendimentos em óleo essencial das plantas analisadas, calculados em base úmida (B.U.) e base seca (ou base livre de umidade, B.L.U.) para fins de comparação. Os resultados em B.L.U. evidenciaram que a amostra L15 apresentou o maior rendimento (4,38%), superior à *Lippia* comum (3,78%). A amostra L10 apresentou rendimento similar à amostra controle (*Lippia* comum), com 3,65%, enquanto os acessos L07 e L42 apresentaram rendimentos um pouco mais baixos e semelhantes entre si e (2,99% e 2,92%, respectivamente). Os genótipos de *Lippia alba* correspondentes aos acessos L40 e L43 apresentaram rendimentos muito baixos, abaixo do esperado para *L. alba*, com menos de 1%.

Figura 10 – Rendimentos dos óleos essenciais dos acessos de *L. alba*

Amostra	Massa de folhas (g)	Volume de óleo (mL)	Umidade (%)	Rendimento	
				(B.U.) (%)	(B.L.U.)(%)
LC	75,36	0,9mL	68,40	1,19	3,78
L07	61,86	0,7mL	62,27	1,13	2,99
L10	86,27	0,8mL	74,63	0,93	3,65
L15	82,60	1,2mL	66,83	1,45	4,38
L40	297,60	0,6mL	77,45	0,20	0,88
L42	131,09	0,7mL	81,74	0,53	2,92
L43	385,50	0,3mL	74,63	0,08	0,31

B.U. – Rendimento em base úmida; B.L.U. – Rendimento em base livre de umidade

5.2 PERFIL E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE *L. alba*

As Figuras 10-16 mostram os cromatogramas fornecidos pelo CG-DIC dos compostos voláteis do óleo essencial da *Lippia* comum e dos 6 acessos da coleção de *Lippia* spp da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN, DF), todos cultivados no Horto de Plantas Medicinais da Embrapa Agroindústria Tropical, CE. Ao todo foram detectados 59 compostos nas amostras analisadas, dos quais 44 foram identificados (Tabela 3). A classe química predominante

foi a dos monoterpenos, representada por 27 compostos. A segunda classe foi a dos sesquiterpenos, com 16 compostos. Também foram detectados 2 álcoois (1-octen-3-ol e 3-octanol).

A Figura 10 apresenta a contagem de área dos picos cromatográficos e o número de compostos de acordo com as classes químicas dos compostos identificados no óleo essencial de todas as amostras. Em todas as amostras, notavelmente os monoterpenos ocupam as maiores contagens de área em relação aos sesquiterpenos. O perfil das amostras LC, L07, L10, L15 e L40 revelaram-se muito similares em relação à área total do cromatograma, enquanto L40 e L43 apresentaram cromatogramas mais pobres, em termos de área dos picos. Em relação ao número total de compostos detectados, a maioria das amostras apresentou uma média de 30 compostos, com exceção da L10, com apenas 26 compostos.

O óleo essencial da amostra LC apresentou o maior percentual de sesquiterpenos (14,05%) em sua composição, enquanto o óleo da amostra L43 apresentou menor percentual, com apenas 3,68% de sesquiterpenos. Os perfis das amostras L07 e L10 revelaram-se bastante similares em relação à porcentagem de área ocupada pelos mono e sesquiterpenos. Em seus cromatogramas, 88,7% da área total são monoterpenos, enquanto 11,31% sesquiterpenos. L15 e L40 também apresentaram praticamente os mesmos teores de monoterpenos (91,22% e 91,58%, respectivamente).

Na Tabela 3, o comportamento de cada composto pode ser identificado individualmente e na Tabela 4 são resumidos os compostos majoritários de cada genótipo. O óleo essencial de *Lippia* comum (LC) apresentou 19 monoterpenos e 13 sesquiterpenos. Essa amostra destacou-se pela elevada concentração de carvona, com 40% da área dos monoterpenos, correspondendo a mais de 200 mg/mL, enquanto nas demais amostras a concentração desse composto foi inferior a 10 mg/mL ou não foi detectado.

Stashenko et al. (2003), em seu estudo sobre métodos de extração do óleo essencial de *L. alba* identificaram cerca de 40 compostos, a carvona representou uma faixa de 40-57% de sua composição, sendo portanto o majoritário. Alea e colaboradores (1996) também caracterizaram em Cuba óleos de *L. alba* que apresentaram altos teores de carvona, cerca de 40% da composição total.

Na *L. alba* o quimiotipo carvona, em concentrações mínimas inibitórias entre 0,31 e 0,63 mg.ml⁻¹ apresenta atividade antibacteriana com ação para gram-positivos, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Streptococcus faecalis* (ALEA et al.,1996).

Figura 11 – Cromatograma fornecido por análise em CG-DIC do óleo essencial da *Lippia alba* comum (LC).

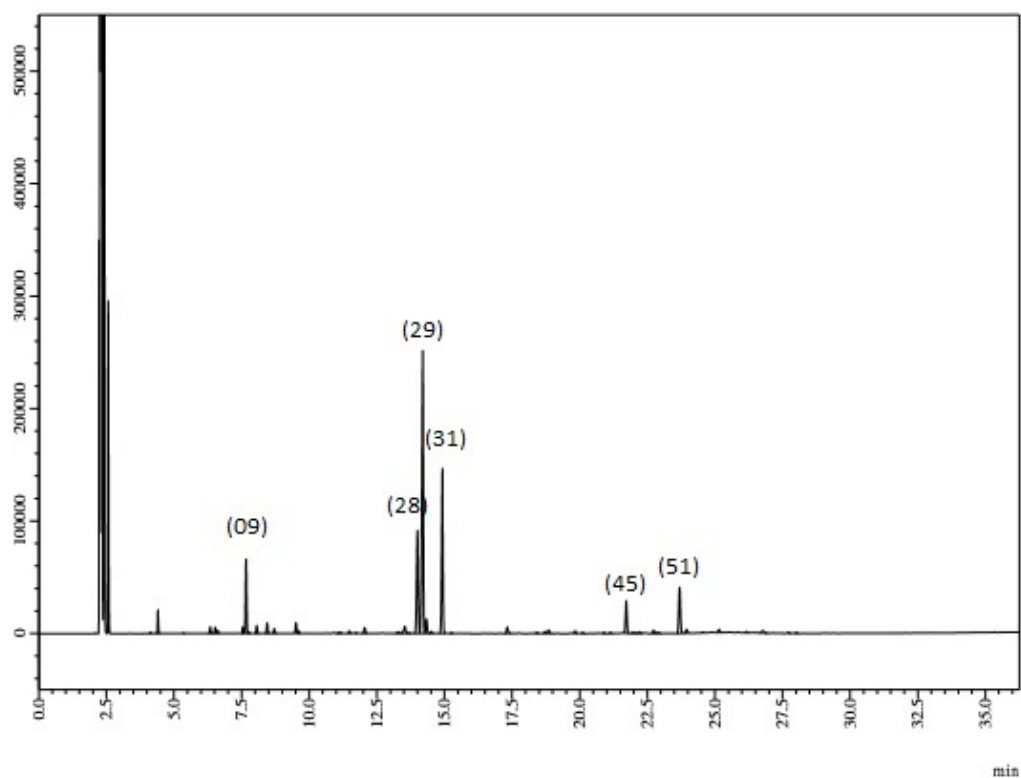


Figura 12 – Cromatograma fornecido por análise em CG-DIC do óleo essencial do acesso L07 da coleção de *Lippia* spp da Embrapa.

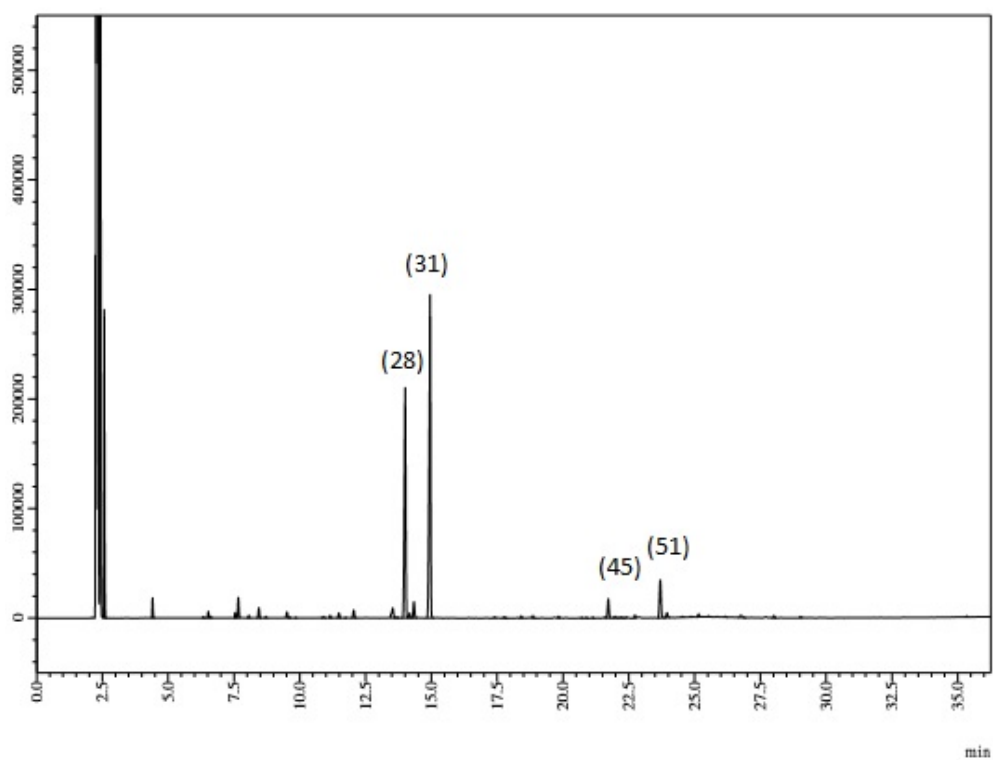


Figura 13 – Cromatograma fornecido por análise em CG-DIC do óleo essencial do acesso L10 da coleção de *Lippia* spp da Embrapa.

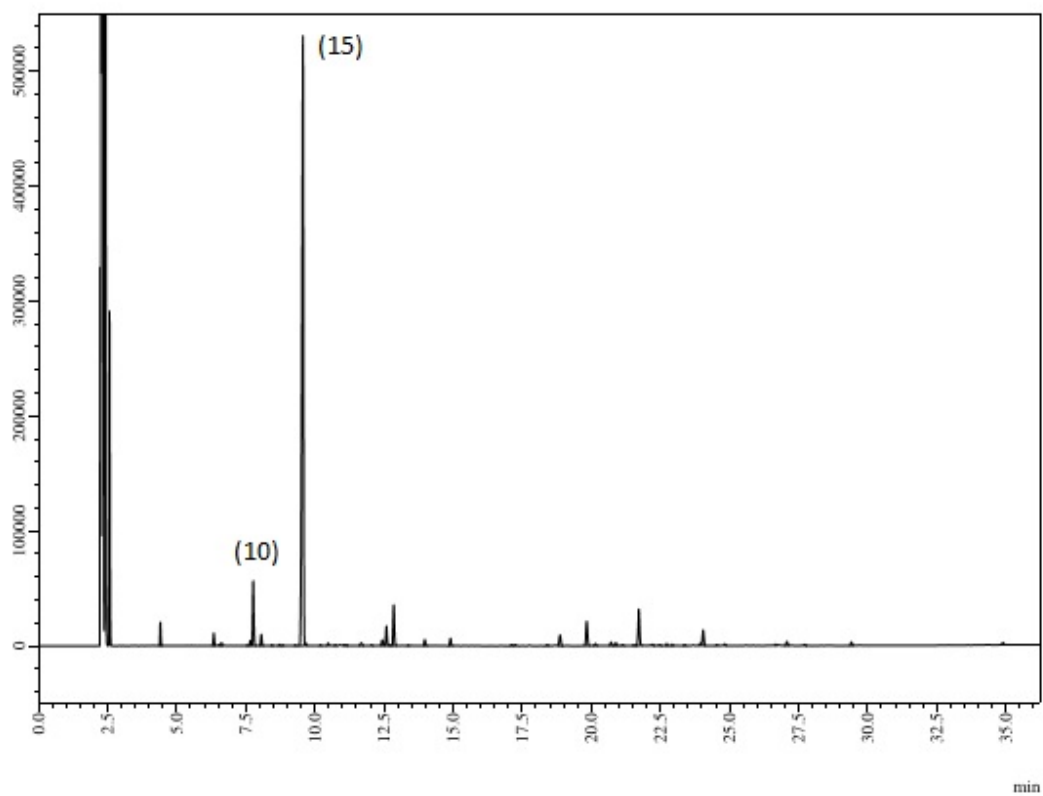


Figura 14 – Cromatograma fornecido por análise em CG-DIC do óleo essencial do acesso L15 da coleção de *Lippia* spp da Embrapa.

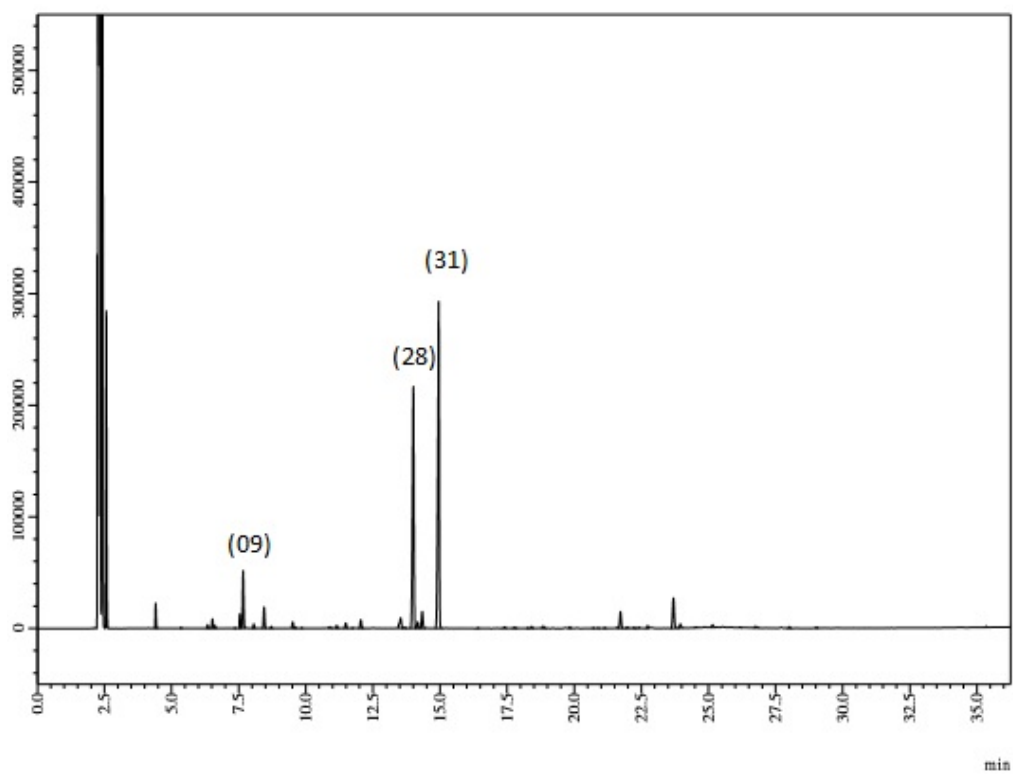


Figura 15 – Cromatograma fornecido por análise em CG-DIC do óleo essencial do acesso L40 da coleção de *Lippia* spp da Embrapa.

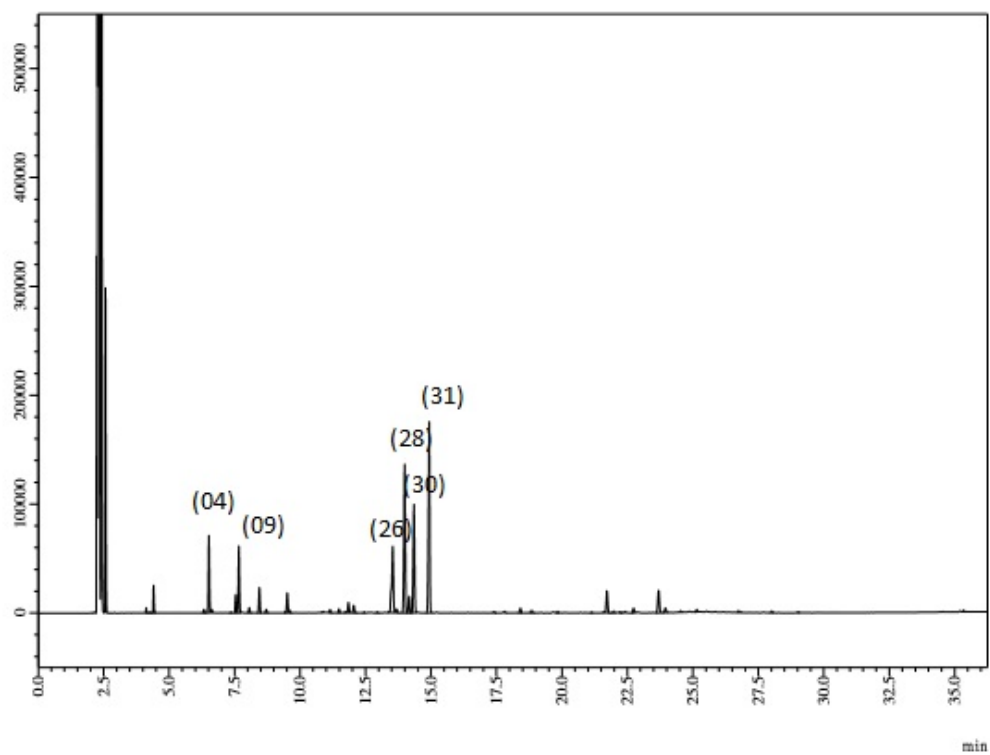


Figura 16 – Cromatograma fornecido por análise em CG-DIC do óleo essencial do acesso L42 da coleção de *Lippia* spp da Embrapa.

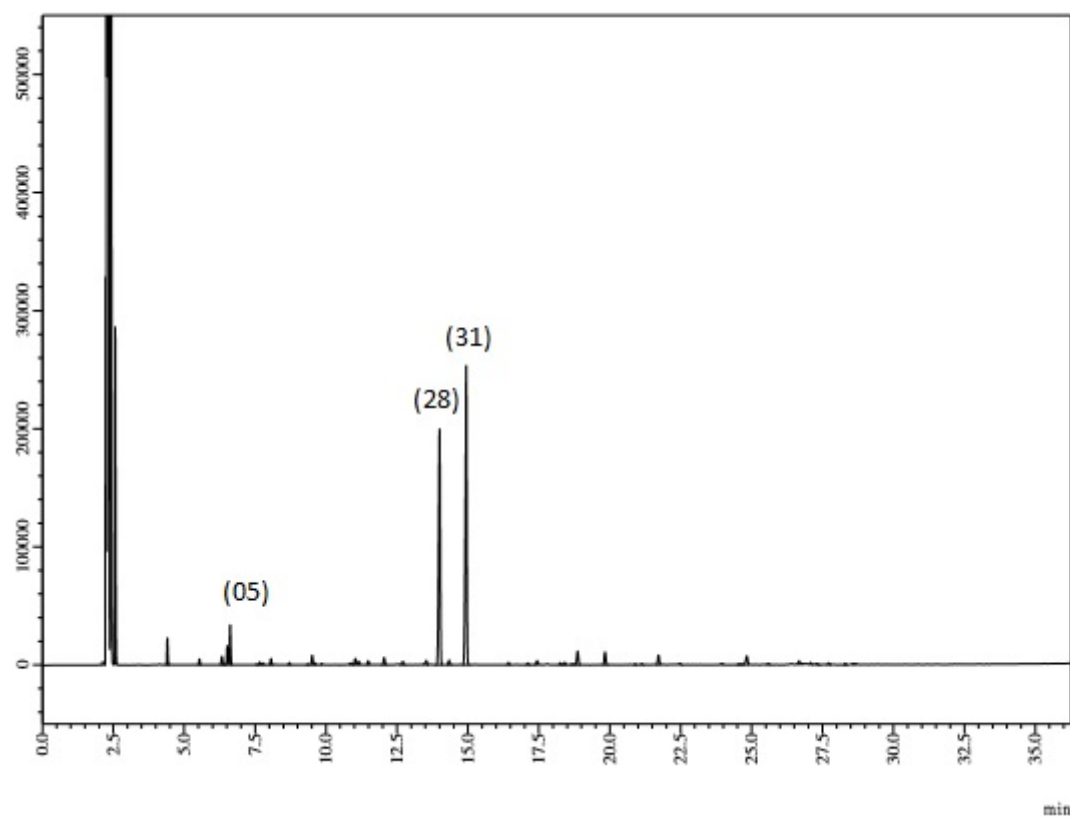


Figura 17 – Cromatograma fornecido por análise em CG-DIC do óleo essencial do acesso L43 da coleção de *Lippia* spp da Embrapa.

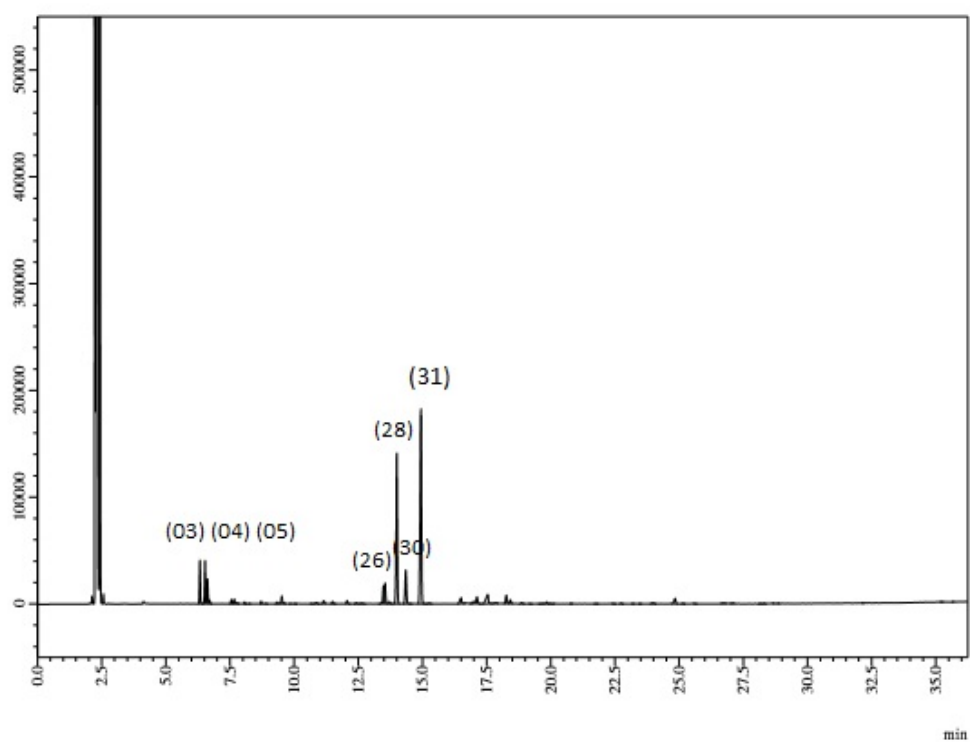
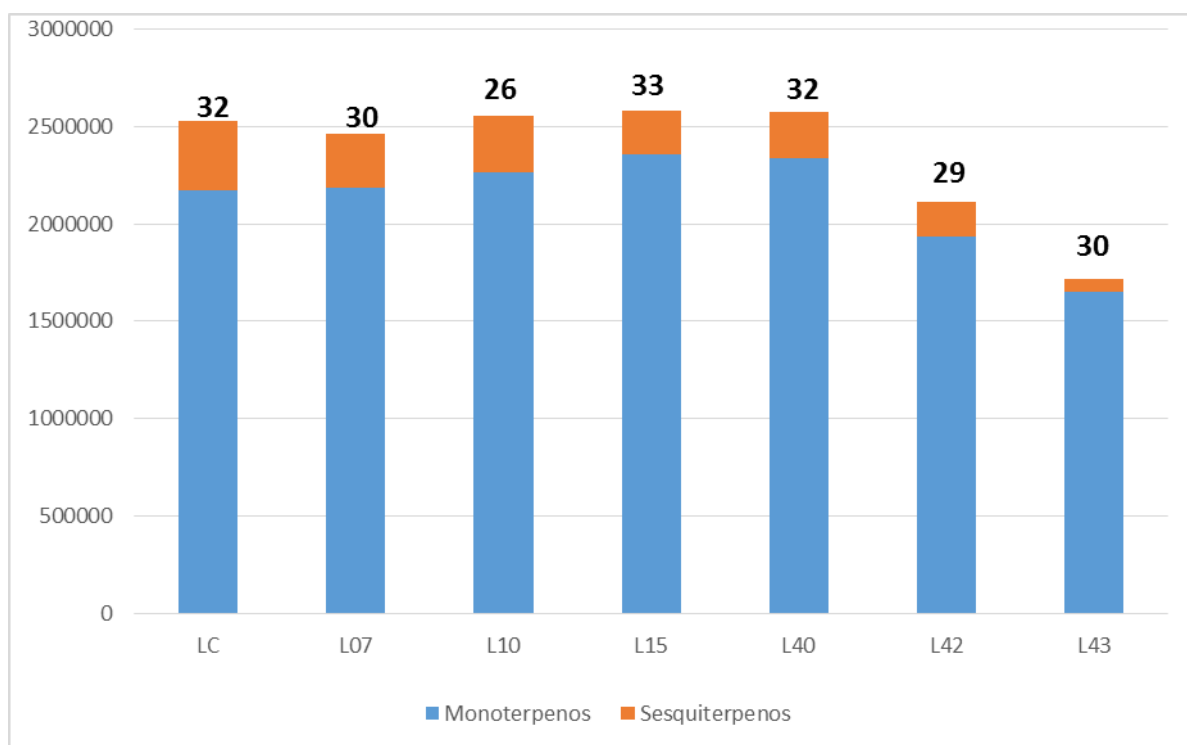


Figura 18 – Área e número de compostos identificados nos acessos de *Lippia alba* por classes químicas majoritárias.



Outros monoterpenos majoritários foram: α -citril, β -citril e limoneno. Dentre os sesquiterpenos destacaram-se o germacreno D e o elemol. O pico relativo a carvona, principal majoritário detectado, foi determinante para caracterizar o respectivo óleo, pois a genótipo de *L. alba* que contém tal terpeno como composto principal é classificado na literatura. (Hennebelle et al., 2006) como quimiotipo III.

Segundo Silva Santos (2002) o limoneno utilizado no comércio é obtido a partir dos óleos essenciais de laranja e cítricos em geral com aplicação em produtos aromáticos nas indústrias farmacêuticas, alimentícia e de solventes.

As amostras de óleo essencial dos acessos L07 e L15 apresentaram elevada semelhança quanto à sua composição de majoritários, representados pelo α -citril, β -citril e elemol, e ao perfil de sesquiterpenos. Para L07 foram identificados 30 compostos, 18 mono, dos quais limoneno, α -citril, β -citril mostraram-se majoritários e 12 sesquiterpenos, enquanto na amostra L15, 33 voláteis foram efetivamente identificados dos quais 21 representaram a classe dos monoterpenos, e 12 sesquiterpenos,

Observa-se na Tabela 3, porque o acesso L15 demonstrou ser o acesso com cromatograma mais rico em relação à área e o número de picos (Figura 8), pois além de os majoritários limoneno

e α e β - citral possuem áreas elevadas, outros monoterpenos como γ -terpineno, terpinen-4ol, *cis* e *trans*- geraniol e sesquiterpenos tais como germacreno D, elemol e nerolidol apresentaram áreas notáveis, além de apresentar também considerável teor de limoneno. No entanto L07 apresentou maior teor de, α e β - citral, correspondendo à 52,74 e 33,87 % do total de monoterpenos, respectivamente, sendo que em L 15 os teores desses compostos foram equivalentes à 48,02 e 32,57 %, respectivamente.

Em L10 foram detectados 26 compostos, 15 monoterpenos e 11 sesquiterpenos, sendo majoritários o linalol e o eucaliptol, demonstrando a singularidade dessa amostra. Embora apresente o menor número de compostos, L10 possui um cromatograma com áreas bastante significativas devido às elevadas áreas de compostos como linalol, eucaliptol, α e β - citral, germacreno D e α e β - cariofileno. A presença do linalol como composto majoritário (86,78 % com relação aos monoterpenos) demonstrando a singularidade dessa amostra. Blanco et al. (2013) descreveram a ocorrência de um quimiotipo contendo linalol como constituinte de maior expressividade, resultado que está em conformidade com a composição do óleo de L10. Lorenzo e colaboradores (2001) caracterizaram no Uruguai um acesso de *L.alba* cujo óleo apresentou como componente principal o linalol (55,00 %) com pureza de 99,00 %. Bahl e colaboradores (2002) identificaram dois acessos de *L. alba* na Índia em que os respectivos óleos essenciais apresentaram composição semelhante, com elevado teor de linalol (65 % e 42,30 %). Tavares e colaboradores (2005) relataram altos teores de linalol em diferentes quimiotipos de *L. alba* durante vários estádios da planta. Nossos resultados também estão de acordo com Pandeló et al. (2012), que registram apenas um quimiotipo portador de eucaliptol. García-Abarrio et al. (2014) relatam que o quimiotipo linalol varia dependendo da sua origem: Índia (61% linalol); Uruguai (55 % linalol, 9 % cariofileno, 1.2 % 1,8 cineol e 0.6 % óxido de cariofileno) ou Brasil (67–83% linalol e 6.5 % 1,8 % cineol).

O composto β -cariofileno é o principal sesquiterpeno de lúpulo e está a ser utilizado como um aditivo em cosméticos sabonetes e perfumes (WICHTEL, 2002). Na medicina herbal, β -cariofileno também é responsável pela leve sedação do lúpulo uma de suas propriedades. Além disso, também demonstra citotoxicidade contra células cancerígenas da mama in vitro (ASAKAWA et al, 1986; DEBARBER et al, 2004).

Na natureza, o linalol possui formas enantiômeras que resulta em modos diferentes de aproveitamento de seus aromas: D-(+) linalol, S-(+)-linalol ou coriandrol com aroma cítrico doce e o L-(-)-linalol, R-(-)-linalol ou licareolcom aroma de lavanda ou de madeira (TAVARES, 2003; LOZANO et al,2003).

O linalol é utilizado em perfumes, cosméticos e aromatizantes. Sua ação antiséptica é superior ao fenol. Possui atividade antiinflamatória, analgésica, antifúngica, inseticida e

antioxidante comparável à vitamina E (EHLERT, 2003; SIMÕES; SPITZER, 2003; TAVARES, 2003).

O acesso L40 revelou o óleo essencial composto por 32 compostos, 21 mono e 11 sesquiterpenos, e o álcool 1-octen-3-ol que co-eluiu com o sabineno na corrida cromatográfica. Os majoritários foram α - e β -citral, *cis* e *trans* geraniol, limoneno, 6metil-5-heptenona, todos monoterpenos. Dentre a classe dos sesquiterpenos podemos citar o germacreno D e o elemol

No óleo do L42 identificaram-se 30 compostos, 19 mono e 11 sesquiterpenos. os monoterpenos majoritários foram α - e β -citral e β -mirceno e dentre sesquiterpenos, β -elemeno, β -cariofileno e óxido de cariofileno. Nessa amostra em particular notou-se a presença do mirtenal em concentração significativa, em relação às demais amostras.

Na amostra do acesso L43, registrou-se a ocorrência de 30 compostos, sendo 20 monoterpenos e *cis* e *trans* geraniol, α - e β -citral, β -mirceno e 6-metil- 5-heptenona como majoritários. Dos 10 sesquiterpenos identificados, óxido de cariofileno foi encontrado em maior concentração. Destacou-se também a presença do 3-octanol, ausente nas demais amostras. O acesso L43 revelou o cromatograma mais pobre com relação à área como se pode observar na Figura 8. Isso ocorre porque mesmo apresentando o número médio de compostos das outras amostras essa em particular tem a maior parte dessa área ocupada pelos majoritários e os demais monoterpenos perfazem áreas reduzidas. Sesquiterpenos como germacreno D e elemol nas demais amostras ocupam áreas bastante significativas, já em L43 essas áreas são diminutas.

O mirceno é utilizado na perfumaria como aromatizante e também como intermediário na preparação de compostos como citral, geraniol e, neral e linalol, que são utilizadas em fragrâncias. Destaca-se na indústria de perfumes pela ação intermediária na preparação de produtos. O tipo α -mirceno não é encontrado na natureza (CHEMICALLANDMYRCENE, 2005).

Em L43, registrou-se a ocorrência de 32 compostos, 20 monoterpenos, dentre os quais *cis* e *trans* geraniol, e α - citral são majoritários apresentando as maiores áreas. Dos 10 sesquiterpenos identificados Óxido de cariofileno foi encontrado em maiores quantidades. Destacou-se também a presença dos álcoois 1-Octen-3-ol que foi identificado nas mesmas condições da amostra L40 e 3-octanol, ausente nas demais amostras.

Tabela 2 – Perfil dos compostos voláteis (concentração em mg/mL) detectados no óleo essencial de genótipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown do Banco de Germoplasma da Embrapa (DF), cultivadas no Horto de Plantas Medicinais da Embrapa (CE).

Nº	Compostos	IK	LC	Acessos					
				L07	L10	L15	L40	L42	L43
1.	α -tujeno	880	0,28±0,01	nd	nd	0,54±0,03	nd	nd	nd
2.	α -pineno	935	nd	nd	nd	nd	nd	2,75±0,30	nd
3.	sabineno + 1-octen-3-ol*	945	4,05 ± 0,15	0,97±0,15	7,59±0,25	1,98±0,08	1,98±0,33	5,73±0,61	23,04±0,15
4.	6-metil-5-heptenona	982	3,50±0,14	3,81±0,58	0,42±0,02	4,61±0,17	31,72±5,31	10,01±1,07	22,76±0,58
5.	β -mirreno	990	1,61±0,06	0,95±0,17	1,66±0,05	1,37±0,06	1,61±0,28	20,62±2,16	13,21±0,17
6.	3-octanol	995	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,13±0,05
7.	(S)-(limoneno) + α -terpineno	998	nd	nd	nd	0,29±0,02	0,34±0,06	nd	nd
8.	r-ocimeno	1025	3,94 ± 0,20	3,37 ± 0,52	0,31±0,01	7,79±0,26	8,28±1,30	0,26±0,03	2,38±0,33
9.	limoneno	1033	45,39 ± 1,85	12,64 ± 2,07	3,30±0,13	30,44±1,33	30,02±5,13	1,58 ± 0,15	2,98±1,07
10.	eucaliptol	1038	0,87±0,04	nd	40,86 ± 1,68	nd	nd	1,08±0,11	5,00±1,09
11.	β -cis-ocimeno	1042	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,02±0,41
12.	(E)- β -ocimeno	1042	4,99±0,20	1,71±0,29	7,07±0,29	2,43±0,11	2,58±0,44	3,71±0,36	1,06±0,05
13.	γ -terpineno	1053	6,58±0,08	6,57±1,11	0,73±0,03	11,71±0,56	12,05±2,14	nd	0,33±0,60
14.	(Z)-hidrato sabineno	1067	3,25±0,15	1,10±0,18	0,98±0,04	1,09±0,03	1,76±0,29	1,35±0,13	1,66±0,11
15.	linalol	1076	7,31±0,41	4,06±0,66	520,52±24,8	3,96±0,13	0,62±0,11	3,36±3,76	5,76±0,38
16.	n.i.	1105	1,90±0,10	0,66±0,11	1,74±0,03	0,75±0,03	1,33±0,22	1,13±0,12	0,85±0,06
17.	n.i.	1107	nd	0,44±0,08	nd	0,45±0,02	nd	0,70±0,09	0,31±0,25
18.	(Z)-sabinol	1115	nd	1,38±0,22	nd	1,28±0,04	0,68±0,09	1,87±0,20	1,38±0,61
19.	n.i.	1151	0,34±0,02	nd	0,47±0,01	nd	nd	4,08 ± 0,44	nd
20.	n.i.	1156	1,13±0,05	2,04±0,32	nd	2,21±0,09	2,03±0,35	nd	2,59±0,15
21.	borneol	1160	1,96±0,10	3,60±0,60	nd	3,42±0,11	2,13±0,38	2,58 ± 0,31	1,48±0,09
22.	n.i.	1170	0,52±0,02	0,35±0,06	3,34±0,13	0,32±0,02	0,60±0,09	nd	nd
23.	terpinen-4-ol	1178	4,61±0,21	8,04±1,90	0,48±0,01	5,56±0,22	4,61±0,80	5,02 ± 0,55	2,34±0,13
24.	α -terpineol	1187	nd	nd	4,37±0,13	nd	0,38±0,05	nd	0,39±0,12
25.	mirtenal	1199	nd	nd	0,41±0,00	nd	nd	3,33±0,38	0,40±0,79
26.	(Z)-geraniol	1208	7,26±0,16	8,62±4,69	nd	9,91±0,35	50,01±8,36	3,71±0,44	14,83±0,64
27.	citronelol	1236	0,64±0,00	0,78±0,13	nd	0,66±0,02	2,83±0,44	nd	1,97±0,13
28.	β -citral	1240	94,43±5,02	187,39±30,9	4,82 ± 0,24	173,41±5,75	87,42±14,56	174,40 ± 19,8	108,14±0,44
29.	carvona	1250	237,42±12,9	3,80±0,60	nd	4,19±0,13	9,30±1,54	nd	nd
30.	(E)-geraniol	1256	11,66±0,64	12,72±2,17	nd	11,71±0,37	63,21±10,72	3,39 ± 0,41	25,13±8,70
31.	α -citral	1261	132,66±7,39	291,40±48,7	5,87±0,31	255,76±8,32	115,70±19,2	233,02±26,87	147,24±0,21
32.	n.i.	1278	nd	nd	0,95±0,02	nd	nd	1,23±0,18	5,60±0,23
33.	n.i.	1348	nd	0,79±0,14	nd	1,04±0,01	0,74±0,11	nd	nd
34.	n.i.	1357	nd	0,28±0,00	nd	0,24±0,00	0,57±0,08	nd	0,51±0,19
35.	n.i.	1370	nd	nd	nd	0,35±0,00	nd	1,58±0,23	6,57±0,02

continua na próxima página

continuação da Tabela 2

	Compostos	Acessos							
		IK	LC	L07	L10	L15	L40	L42	L43
36.	copaeno **	1383	0,88±0,04	1,67±0,29	1,06±0,02	1,36±0,04	2,90±0,49	1,88±0,23	3,03±0,
37.	α -bourboneno	1387	1,71±0,11	nd	nd	nd	nd	0,96±0,08	
38.	β -elemeno	1396	3,84±0,26	2,41±0,45	9,78±0,04	2,16±0,09	2,06±0,35	11,24±1,28	1,10±0,02
39.	β -cariofileno	1401	2,34±0,10	1,47±0,24	21,13±0,34	1,05±0,06	0,78±0,12	10,33±1,17	1,72±0,04
40.	γ -elemeno	1434	0,92±0,05	nd	2,12±0,04	nd	nd	nd	0,27±0,04
41.	n.i.	1443	nd	0,44±0,09	1,68±1,95	0,37±0,02	nd	nd	nd
42.	α -cariofileno	1463	0,71±0,03	0,38±0,08	2,75±0,03	0,30±0,02	nd	0,60±0,08	nd
43.	aromandreno	1468	0,99±0,04	0,57±0,11	0,92±0,01	0,50±0,02	0,42±0,04	0,73±0,08	nd
44.	n.i.	1476	nd	0,47±0,05	nd	0,51±0,01	0,53±0,01	nd	nd
45.	germacreno D	1490	28,62±1,48	16,72±9,00	31,43±0,41	13,13±0,46	14,70±2,51	7,78±0,79	0,36±0,64
46.	(Z,E)- α -farneseno	1494	1,11±0,04	1,62±0,31	nd	1,18±1,15	1,21±0,21	nd	nd
47.	n.i.	1502	1,63±0,08	1,00±0,18	1,34±0,02	0,70±0,02	0,67±0,12	nd	nd
48.	γ -muuroleno	1511	nd	0,59±0,09	nd	0,51±0,02	0,74±0,11	nd	nd
49.	guaieno	1517	nd	nd	0,84±0,01	nd	nd	0,76±0,08	nd
50.	n.i.	1520	3,05±0,16	2,48±0,44	1,79±0,02	2,08±0,06	2,96±0,49	nd	0,62±0,13
51.	elemol	1529	42,26±2,35	34,22±5,94	nd	24,04±0,92	15,12±2,75	nd	0,39±0,35
52.	nerolidol	1562	3,38±0,19	4,27±0,81	1,92±0,05	3,11±0,09	2,93±0,50	0,72±0,09	0,91±0,44
53.	n.i.	1570	0,37±0,00	0,58±0,12	0,68±0,00	0,41±0,02	0,72±0,12	0,56±0,10	nd
54.	óxido de cariofileno	1589	nd	nd	1,29±0,03	nd	nd	8,86±1,19	5,75±0,00
55.	cubenol	1599	3,06±0,16	2,66±0,47	nd	2,15±0,04	1,72±0,29	nd	0,51±0,78
56.	n.i.	1611	1,03±0,06	0,68±0,12	nd	0,373±0,023	nd	nd	nd
57.	β -eudesmol	1648	3,92±0,24	3,43±0,64	1,22±0,05	1,85±0,20	1,39±0,23	0,40±0,00	0,38±0,47

Nd – não detectado; *1-octen-3-ol coeluiu com sabineno apenas na amostra L43; **sesquiterpenos a partir do copaeno; IK: Índice de Kovats na coluna DB-5; n.i.: não identificado; nd: não detectado

Tabela 3 – Compostos voláteis majoritários do óleo essencial de genótipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown do Banco de Germoplasma da Embrapa (DF), cultivadas no Horto de Plantas Medicinais da Embrapa (CE).

	LC	Acessos					
		L07	L10	L15	L40	L42	L43
carvona	x						
α -citral	x	x		x	x	x	x
β -citral	x	x		x	x	x	x
limoneno	x			x	x	x	
linalol			x				
β -mirceno						x	x
geraniol					x		x
eucaliptol			x				
β -cariofileno			x			x	
Henebelle (2006)	III	I	I	I	I	I	I
Matos (1996)	3	2		2	2	1	1

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

5.3.1. Análise de Cluster

Para agrupar as amostras quanto ao seu perfil de voláteis completo, e não apenas quanto aos majoritários, os dados foram submetidos à Análise de Agrupamento Hierárquico (cluster). Na Figura 18, quanto menor a dissimilaridade (valores do eixo Y próximos de zero), maior a semelhança entre as amostras. Observa-se que foram formados 4 grupos:

Cluster 1: L40 e L43

Cluster 2: L07, L15 e L42

Cluster 3: L10

Cluster4: LC

Observa-se que acessos do quimiotipo I (Hennebelle et al., 2006a) separaram-se em dois grupos, devido à presença de outros compostos também presentes em concentrações expressivas, compartilhados pelas amostras. Os acessos L40 e L43 agruparam-se, possivelmente devido à presença dos compostos 6-metil-5-hepten-2-ona, *Z*-geraniol e *E*-geraniol, também predominantes nessas amostras.

Por sua vez, as amostras L07, L15 e L42 também pertencentes ao quimiotipo I, formaram outro grupo, por apresentar perfis de voláteis bastante semelhantes. Observa-se que a amostra L42 distancia-se um pouco das demais, devido ao fato de apresentar β -mirceno em concentração considerável. De acordo com Matos (1996) isso ocorre porque o acesso pertence ao quimiotipo mirceno-citral (quimiotipo 1), enquanto L07 e L15 são do quimiotipo limoneno-citral (quimiotipo 2). As amostras LC e L10 formam grupos individuais, pois possuem uma composição singular, visto que seus majoritários a carvona e o linalol respectivamente são compostos presentes de forma diminuta nas demais amostras.

5.3.2. Análise de Componentes Principais

A Figura 19 apresenta o gráfico biplot da Análise de Componentes Principais (ACP) dos compostos voláteis do óleo essencial dos acessos de *Lippia alba*, onde é possível visualizar os voláteis que caracterizam cada uma das amostras. Nessa figura, as amostras ficam localizadas próximas aos vetores (variáveis) que as caracterizam e as amostras que se localizam na mesma região do gráfico apresentam perfis de voláteis semelhantes entre si. É preciso chamar a atenção do leitor para o fato de que as linhas dos vetores foram apagadas, restando apenas o ponto final do vetor, que determina o seu comprimento.

Quanto à discriminação entre as amostras, observou-se concordância com o resultado da análise de agrupamentos (cluster), obtendo-se a separação das amostras LC e L10 em quadrantes diferentes; a L07 e a L15 muito semelhantes, praticamente no mesmo ponto do gráfico; e a L40 e a L43 próximas, no quadrante inferior esquerdo. Somente a L42, que deveria estar próxima ao grupo da L07/L15 ficou separada. Isso ocorre porque esse gráfico bidimensional só representa a variação entre as amostras nas duas primeiras coordenadas (F1 e F2), enquanto a análise de agrupamento (cluster) leva em consideração a variabilidade total. Na Tabela 4 observa-se que as duas primeiras componentes (F1 e F2) conseguiriam explicar 64,48% da variabilidade entre as amostras, mas a terceira componente (F3) ainda contribui com mais de 16%, indicando que existem variáveis (compostos voláteis) que só foram importantes nessa componente, sendo necessário um gráfico tridimensional para melhor visualizar a separação entre as amostras.

Figura 19 – Análise de agrupamento Hierárquico (clusters dos compostos voláteis (concentração em mg/mL) detectados no óleo essencial de genótipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown do Banco de Germoplasma da Embrapa (DF), cultivadas no Horto de Plantas Medicinais.

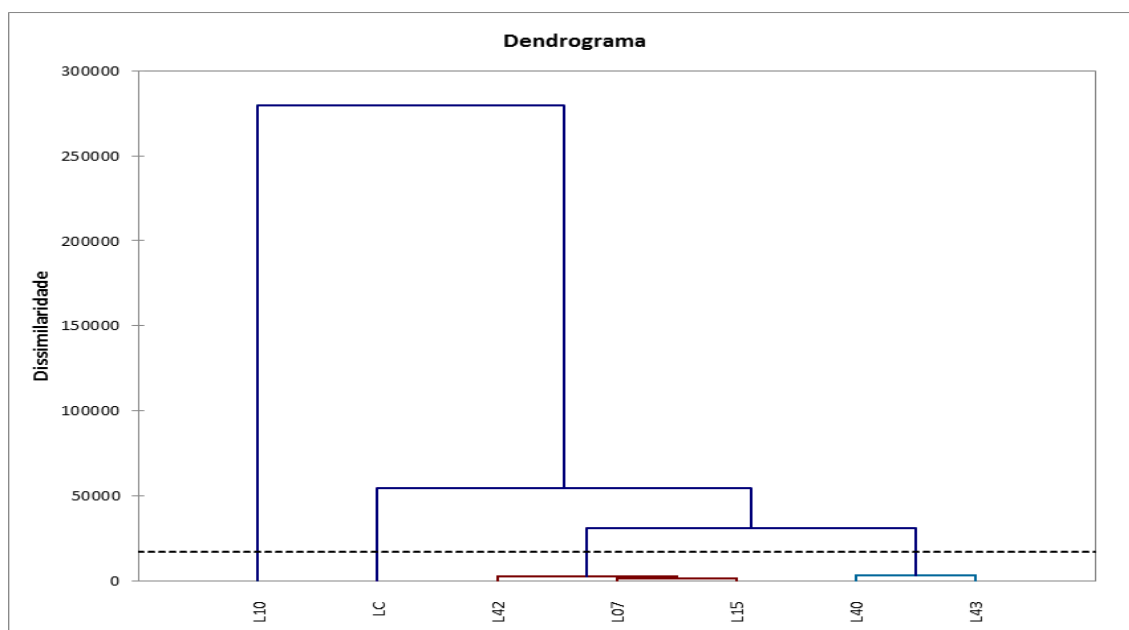
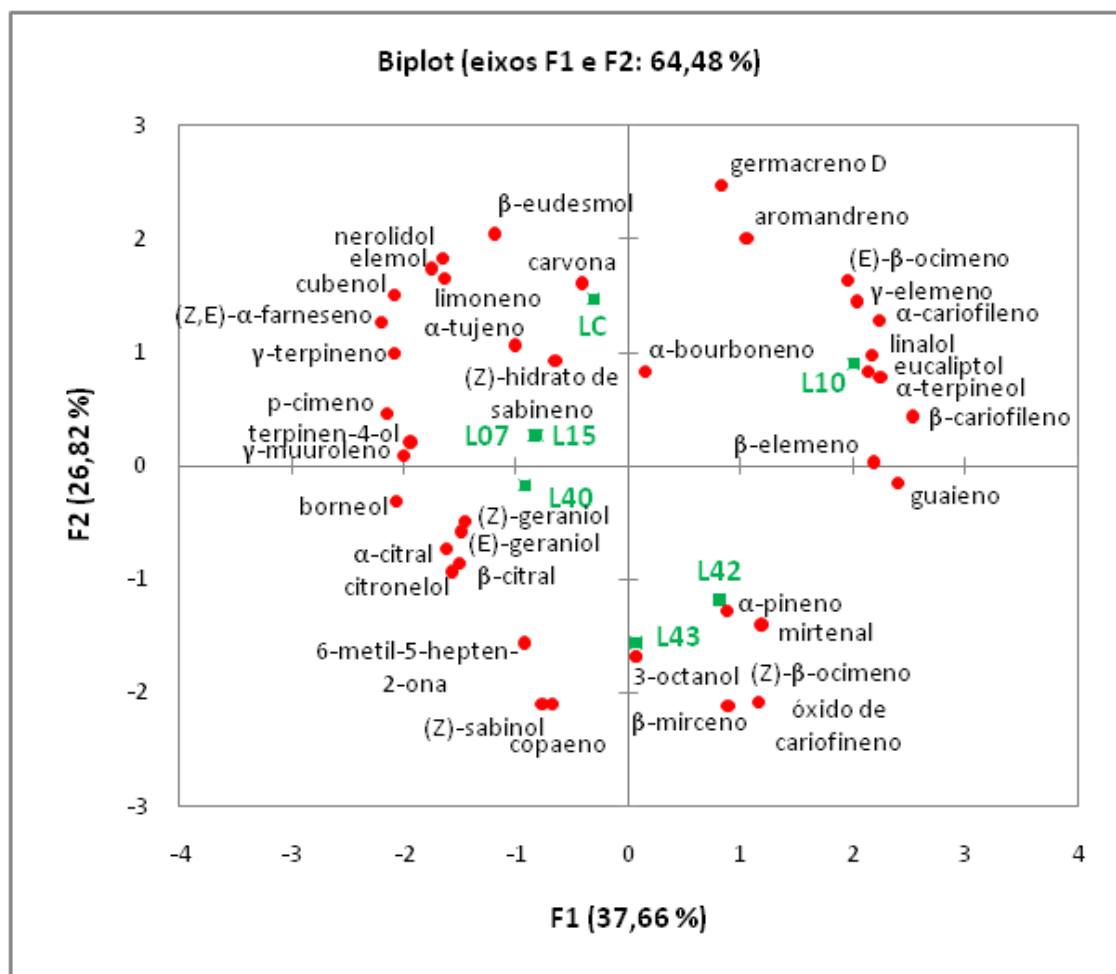


Figura 20 – Análise de Componentes Principais dos compostos voláteis detectados no óleo essencial de genótipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown do Banco de

Germoplasma da Embrapa (DF), cultivadas no Horto de Plantas Medicinais da Embrapa (CE).



No gráfico biplot da ACP (Figura 19), observa-se que a amostra de *Lippia Alba* comum (LC) destacou-se pela alta concentração de carvona e limoneno, apresentando também quantidades dos sesquiterpenos β -eudesmol, cubenol, nerolidol e elemol. Os óleos essenciais dos acessos L07 e L15 apresentaram perfis de voláteis muito semelhantes entre si e foram os mais parecidos com a *Lippia alba* comum, ficando no mesmo quadrante superior esquerdo. De modo inverso, o genótipo L10 mostrou perfil bastante diverso da *Lippia* comum, caracterizando-se por apresentar a maior concentração do monoterpene linalol (é seu composto majoritário) e dos sesquiterpenos α - e β -cariofileno, germacreno D e γ -elemeno, além de ser a única amostra com α -terpineol e eucaliptol em concentrações significativas (Tabela 3).

Nos quadrantes inferiores pode-se observar tanto a semelhança entre as amostras L43 e L42 quanto aos teores de óxido de cariofileno e β -mirceno, como a semelhança entre as amostras L43 e L40 quanto a (Z) - e (E)-geraniol, α - e β - citral e 6-metil-5-hepten2-ona. Os acessos L40 e

L43 também mostram rico perfil de compostos voláteis, com elevados teores da maioria dos compostos localizados à esquerda do gráfico, especialmente monoterpenos. O genótipo L43 foi a única amostra que apresentou 3-octanal, enquanto o L42 é praticamente a única amostra que possui os monoterpenos α -pineno e mirtenal.

Tabela 4 – Autovalores e variabilidade acumulada nos Componentes Principais dos compostos voláteis de genótipos de *Lippia alba*.

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Autovalor	15,065	10,727	6,587	3,809	2,591	1,220
Variabilidade (%)	37,66	26,82	16,47	9,52	6,48	3,05
% acumulada	37,66	64,48	80,95	90,47	96,95	100,00

5.3.3. Análise Sensorial

A Tabela 6 apresenta os resultados de frequência dos descritores associados a cada amostra por uma equipe de 35 julgadores no teste sensorial (CATA) para o aroma do óleo essencial da *Lippia* comum (LC) e dos acessos de *Lippia alba*. Esses dados foram submetidos à análise multivariada chamada Análise de Correspondência. O resultado do teste Qui-quadrado foi não significativo para $\alpha=0,05$ (p-valor = 0,94), não rejeitando a hipótese nula, ou seja, indicando que as linhas e colunas são independentes, e a análise de correspondência pode ser realizada:

H₀: Não há uma dependência entre as linhas e as colunas da tabela (são independentes).

H_a: Há uma dependência entre as linhas e colunas da tabela (são dependentes)

A Figura 20 apresenta o resultado da Análise de Correspondência. Às amostras L07 e L10, localizadas no quadrante superior direito, foram atribuídas características de aroma floral e tempero. O aroma da amostra L43 foi descrito pela maioria dos julgadores pelos termos menta, verde, madeira, terra e pimenta.

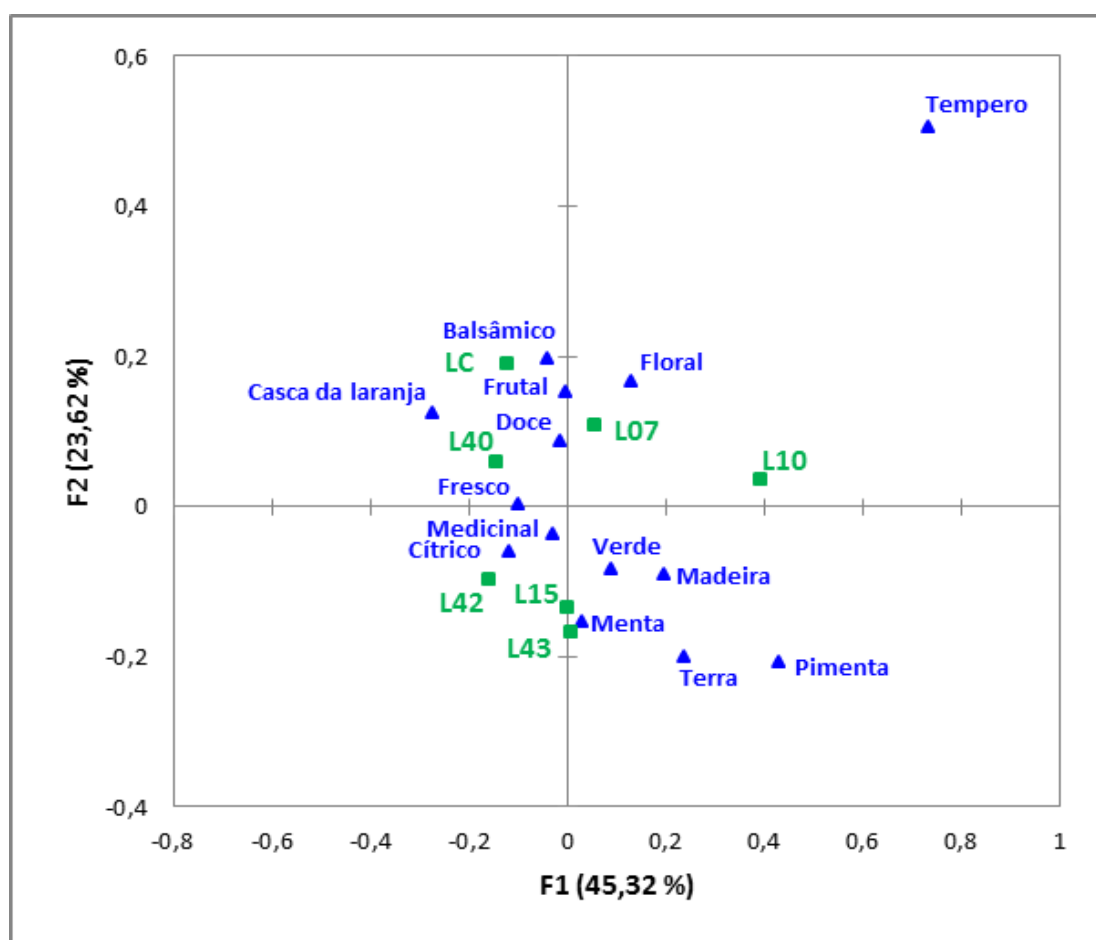
As amostras *Lippia* comum (LC) e L40 ficaram localizadas no quadrante superior esquerdo, porém, enquanto a LC foi associada aos odores balsâmico, frutal, doce, a L40 apresentou notas mais fortes de aroma fresco e casca de laranja.

Por sua vez, nas amostras L15 e L42, localizadas no quadrante inferior esquerdo, houve predominância de odor medicinal e cítrico. No entanto, a L15 também está muito perto da amostra L43, caracterizada com forte aroma de menta.

Tabela 5 – Frequência de julgadores que marcaram os descritores de odor no teste CheckAll-That-Apply (CATA) para aroma do óleo essencial de acessos de *Lippia alba*.

Descritores de odor	Acessos						
	LC	L07	L10	L15	L40	L42	L43
Verde	19	22	24	26	21	20	25
Madeira	4	7	6	8	3	4	5
Cítrico	18	13	11	19	17	18	16
Fresco	18	15	13	14	19	20	16
Balsâmico	4	3	3	3	5	2	2
Terra	2	3	5	4	3	3	5
Pimenta	1	1	5	5	3	1	2
Medicinal	15	18	14	18	17	19	15
Casca da laranja	18	14	4	15	18	12	9
Floral	9	5	10	5	7	7	4
Doce	12	12	9	10	11	9	9
Menta	4	7	6	6	7	7	9
Tempero	3	5	6	1	1	0	1
Frutal	5	5	4	3	7	2	5

Figura 21– Gráfico simétrico gerado pela Análise de Correspondência dos dados do teste CATA para aroma dos óleos essenciais de *Lippia alba*.



6 CONCLUSÕES

Os acessos de *Lippia alba* do BAG da Embrapa, embora pertençam a mesma espécie e tenham sido cultivados sob as mesmas condições, fornecem óleos essenciais de composição química bem variável em relação a compostos majoritários, tais como mirceno, citral, limoneno e linalol, o que caracteriza os quimiotipos característicos da espécie.

Foram identificados os quimiotipos carvona para a amostra LC, citral para os acessos L40 e L43, L10 foi identificado como pertencente ao quimiotipo linalol, L07 e L15 pertencem ao quimiotipo limoneno-citral, já o acesso L42 revelou pertencer ao quimiotipo mirceno-citral.

Algumas amostras mostram similaridade entre si como L40 com L43 e L07 e L15 com L42, sendo que essas últimas e a apresentam similaridade à *Lippia* comum. Por sua vez a amostra L 10 apresentou um perfil bem diferente em relação às demais.

Esses resultados mostram a riqueza e relevância dos óleos uma vez que grande parte dos compostos tidos como majoritários são de grande importância industrial.

REFERÊNCIAS

- ALEA, J. A. P.; ORTEGA, A. G.; ROSADO, A.; RODRIGUEZ, M.; BALUJA, R. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Rev Cubana Farm** v. 30, p. 1–8, 1997.
- ANDRIGHETTI-FROHNER, C. R.; SINCERO, T.C.M.; DA SILVA, A.C.; SAVI, L.A.; GAIDO, C.M.; BETTEGA, J.M.R.; MANCINI, M.; DE ALMEIDA, M.T.R.; BARBOSA, R.A.; FARIAS, M.R.; BARARDI, C.R.M.; SIMOES, C.M.O. (). Antiviral evaluation of plants from Brazilian atlantic tropical forest. **Fitoterapia** v.76, p.374-378, 2005.
- ANTUNES, O. A. C. Interfaces com a indústria. **Química Nova**, v. 28, suplemento, S64S75, 2005.
- AQUINO, L.C.L.; SANTOS, G.G.; TRINDADE, R.C.; ALVES, J.A.B.; SANTOS, P.O.; ALVES, P.B.; BLANK, A.F.; CARVALHO, L.M. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de erva-cidreira e manjeriço frente a bactérias de carnes bovinas. **Alim. Nutr.**,v.21 (4),p. 529-535, 2010.
- ARRAS, G.; GRELLA, G.E. Wild thyme, *Thymus capitatus*, essential oil seasonal changes and antimycotic activity. **J Hortic Sci Biotech** v. 67:p. 197-202, 1992.
- ARZEDI, E., PALMAS, F. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. **Letters in Applied Microbiology** v.29, p.130– 135, 1999.
- ASAKAWA, Y., ISHIDA, T.; TOYOTA, M.; TAKEMOTO, T. Terpenoid biotransformation in mammals. IV. Biotrasformation of (+)-longifolene, (-)-caryophyllene, (-)-caryophyllene oxide, (-)-0-cyclocolorenone, (+)-nootkatone, (-)-elemol, (-)-abietic acid and (+)- dehydroabietic acid in rabbits. **Xenobiotica**, v.16: p. 753-767.
- BADIES, A. Z. Antimycotic effects of Cardamom essential oil components on toxigenic molds. **Egyptian Journal of Food Science**, Giza, v.20, p.441-452, 1992.
- BAHL, J. R.; GARG, S. N.; SINGH, S. C.; BANSAL, R. P.; NAQUI, A. A.; KUMAR, S. Composition of linalool rich essential oil from *Lippia alba* grown in Indian plains. **Flavour and Fragrance Journal, Glasgow**, v.15, n.3, p.199-200, 2000.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food. Chem. Toxicol.**,v. 46,p. 446-475, 2008.
- BASER, K. H. C.; Buchbauer, G. Handbook of essential oils: science, technology, and applications, 2010.
- BENZECREI, P.J. **Correspondence Analysis Handbook**. New York: Marcel Dekker Ed., 1992.
- BEZERRA, A. M. E.; MEDEIROS-FILHO, S; OLIVEIRA, L. D. M.; SILVEIRA, E. R. Produção e composição química da macela em função da época de colheita. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 26- 29, 2008.
- BIASE, L.A.; COSTA, G. Propagação vegetativa de *Lippia alba*. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.33, n.3, p.455-459, 2003.
- BNDES; **Potencial de diversificação da indústria química brasileira: Relatório 4 – Aromas, sabores e fragrâncias**. Bain & company, 1ª Ed., Mai 2014.
- BOTTEGA, S.; CORSI, G. **Botanical Journal of the Linnean Society**., v.132, p.325335, 2000.

BUSATTA, C, **Caracterização Química e Atividade Antimicrobiana in vitro e em alimentos dos extratos de orégano e manjerona**. 2006 Dissertação (Mestrado), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, Rio Grande do Sul, 2006.

CASTRO, D.M.; MING, L.C.; MARQUES, M.O.M. Biomass production and chemical composition of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown Britt & Wilson in leaves on different plant parts in different seasons. **Acta Hort.** (ISHS) v. 569, p.111-115, 2002.

CHAMORRO, E. R., ZAMBÓN, S. N., MORALES, W. G., SEQUEIRA, A. F., VELASCO, G. A.). Study of the Chemical Composition of Essential Oils by Gas Chromatography, Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications, Dr. Bekir Salih (Ed.), ISBN: 978-953-51-0127-7, InTech, disponível em: <http://www.intechopen.com/books/gas-chromatography-in-plantsciencewine-technology-toxicology-and-some-specific-applications/study-of-thechemical-composition-of-essentialoils-by-gas-chromatography//acesso em:27/01/2016>, 2012

CHEMICALLAND.MYRCENE. Disponível em: <http://www.chemicalland21.com/specialtychem/perchem/myrcene.htm> acesso em 18/02/2016,

COSENTINO, S., TUBEROSO, C.I.G., PISANO, B., SATTI, M., MASCIA, V. chromatography, mass spectrometry, GC/FTIR and GC/AES after in halation of sandalwood oil. **Biomed Chromatogr** v. 6, p. 133–134.

CORRÊA, C. B. V. Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britt. & Wilson - erva cidreira. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v.73, n.3, p.5764, 1992.

COSTA, M.C.C.D.; AGUILAR, J.S.; DO NASCIMENTO, S.C. Atividade citotóxica de extratos brutos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). **Acta Farm. Bonaeren.** v. 23, p. 349-352, 2004.

DEBARBER, A.E.; BLEYLE, L.A.; ROULLET, J.B.O.; KOOP, D.R. Omega-hydroxylation of fernesol by mammalian cytochromes p450. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1682: p. 18-27, 2004.

DESJARDINS, A. E. Natural Product Chemistry Meets Genetics: When Is a Genotype a Chemotype? **J.Agric. Food. Chem.** v. 56, p. 7587-7592, 2008.

DI STASI, L. C. ; HIRUMA, C. A.; GUIMARÃES, E.M.; SANTOS, C.M. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. **Fitoterapia** v.65, p.529-540, 1994.

EHLERT, P. A. D. Épocas de plantio, idade e horário de colheita na produção e qualidade do óleo essencial do quimiotipo limoneno-carvona de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. Botucatu, SP: 2003 107 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” São Paulo, 2003.

ETTRE, L.S. The Kováts retention index system. **Analytical Chemistry**, v.36, p. 31A-41A, 1964.

FALEIRO, M.L., MIGUEL, M.G., LADEIRO, F., VENANCIO, F., TAVARES, R., BRITO, J.C., FIGUEIREDO, A.C., BARROSO, J.G., PEDRO, L.G., Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese, 2002.

FRANCO, M.R.B. Aroma e sabor de alimentos: temas atuais. São Paulo: Livraria Varela, 2003.

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.

GAZOLA, R.; MACHADO, D.; RUGGIERO, C.; SINGI, G.; ALEXANDRE, M.M. *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous extratcts on the isolated hearts of rats. **Pharmacol. Research**, v. 50, p.477-480, 2004.

GROB, K. Injection techniques in capillary GC. *Analytical Chemistry*, v.66, p. 1009A1019A, 1994.

GUZMÁN, S., R.CARDOSO & V. GARCÍA. **Desarrollo agrotecnológico de Lippia alba (Miller) N.E. Br. ex. Britton & Wilson**. Guillermo de Ockhman v. 7, p. 201-215, 2004.

HARBORNE, J.B. **Ecological Biochemistry, Academic**, 4^a ed., London, England, 1993.

HARREWIJN, P.; VAn OOSTEN, A. M.; PIRON, P. G. M.; *Natural Terpenoids as Messengers*.

HENDERSON, L.; WOLFREYS, A.; FEDYK, J.; BOURNER, C.; WINDEBANK, S. The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*, v.13, p.89-94, 1998.

HENNEBELLE T, SAHPAZ S, DERMONT C, JOSEPH H, BAILLEUL F. The essential oil of *Lippia alba*: Analysis of samples from French Overseas Departments and review of previous works. **Chem Biodivers** v.3: p.1116–1125, 2006.

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

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P.D. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v.97, p.1027-1031, 2002.

INBIO INSTITUTO NACIONAL DE BIODIVERSIDADE. Costa Rica dez 2015.

Disponível em: <<http://www.inbio.ac.cr/es/default.htm>> Acesso em: 01 dez 2015.

JAGER, W.M.; MAYER, G. RESNICEK; BUCHBAUER, G. Percutaneoseabsorbtion of the monoterpene carvone: Implication of stereoselective metabolism on blood. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 53: p.637-642, 2001.

JIROVETZ L, BUCHBAUER G, JAGER W, WOIDICH A, NIKIFOROV A

(1992). Analysis of fragrance compounds in blood samples of mice by gas

JOULAIN, D. Modern analysis methodologies: use and abuse. *Perfumer & Flavorist*, v.19, p. 5-17, 1994.

JULIANO, C., MATTANA, A., USAI, M., 2000. Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona*

JÚNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 382-87, 2007.

KARR, L. L.; DREWES, C. D.; COATS, J. R. **Toxic effects of dextro-limonene in the earthworm *Cisenia foetida* (Savigny). *Pesticidal Biochemical Physiology*, Oxford, v.36, p.175-186, 1990.**

LANCASTER, B.; FOLEY, M. Determining statistical significance for choose-all-that apply question responses. **Seventh pangborn sensory science symposium**, Minneapolis, USA, 2007.

LOISEL GROWING WILD IN SARDINIA. JOURNAL OF ESSENTIAL OIL RESEARCH 12, 516–522.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A.; Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas, Instituto Plantarum: São Paulo, 2002; Martins, E. R.; Castro, D. M.; Castellani, D. C.; Dias, J. E.; Plantas Medicinais, Ed. UFV: Viçosa, 2002.

LORENZO D; PAZ D; DAVIES P; VILA R; CANIGUERAL S; DELLACASSA E.. Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown from Uruguay. *Flavour and Fragrance Journal* 16: 356-359, 2001.

LOZANO, M.M.S.; PINHEIRO, D.M.; PASTORE, G.M. Obtenção de compostos

MANLY, B.F.J. Métodos estatísticos multivariados: uma introdução. 3 ed., Porto Alegre: Bookman, 2008, 220p.

MARINO, M., BERSANI, C., COMI, G., 1999. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *Journal of Food Protection* 62 (9),

MAROTTI, M.; PICCAGLIA, R.; GIOVANELLI, E. Effects of variety and ontogenic stage on the essential oil composition and biological activity of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) *J. Essential Oil Res.* V. 6: P.57-62, 1994.

MATOS, F.J.A. 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* v.77; p.137–141, 1996.

MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W. (1996). Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in northeast Brasil. *J. Essent. Oil Res.*, v.8, p.695-698, 1996.

MCGIMPSEY, J.A., DOUGLAS, M.H., VAN KLINK, J.L., BEAUREGARD, D.A., PERRY, N.B. Seasonal variation in essential oil yield and composition from naturalized *Thymus vulgaris* L. in New Zealand. *Flavour and Fragrance Journal* v. 9, p.347– 352, 1994.

MINIM, V.P.R. Análise Sensorial: estudos com consumidores. Viçosa:Ed. UFV, 2006.

MULDER, T.; VERSPAGET, H.; SIER, C. Glutethione S-transferase-pi in colorectal tumors is predictive for overall survival. *Cancer Res* v.55: p.2696-2702, 1995.

MÚLGURA DE ROMERO, M.S.; MARTINEZ, A. SUYAMA. Morfología de las inflorescências en *Lippia* (Verbenaceae). *Darwiniana* v.36, p.1-12, 1998.

OLIVEIRA, A.C. Atividade de óleos essenciais e exsudatos de plantas sobre espécies fúngicas isoladas de frutas in natura. Dissertação de mestrado. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, Brasil, 2000.

OLIVEIRA, D.R.; LEITAO, G.G.; SANTOS, S.S.; BIZZO, D.H.R.; LOPES, D.; ALVIANO, C.S.; ALVIANO, D.S.; LEITÃO, S.G. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximina, Brazil. *J. Ethnopharmacol.* v.108, p.103-108, 2006.

OPDYKE, D. L. Monographs on fragrance raw materials. Food and Cosmetics Toxicology Supplement, New York, v.17, p.695-923, 1979.

PARRA-GARCÉS, M.I.; CAROPRESE-ARAQUE, J.F. ; ARRIETA PRIETO, D.; STASHENKO, E. Morfología, anatomía, ontogenia y composición química de metabolitos secundários en inflorescências de *Lippia alba* (Verbenaceae). **Rev. Biol.Trop.** v. 58 (4): 1533-1548, 2010.

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

PEREIRA PINTO, J.E.B.; SANTIAGO, E.J.J.; LAMEIRA, O.A. Compêndio de plantas medicinais. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000.

PESSINI GL; HOLETZ FB; SANCHES NR; CORTEZ DAG; DIAS FILHO BP; NAKAMURA C.V. Avaliação de atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizadas na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.13, p. 21-24, 2003.

PRABUSEENIVASAN, S.; JAYAKUMAR, M.; IGNACIMUTHU, S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Compl Alternative Medicine**, v. 6, p. 39, 2006.

REINECCIUS, G. **Choosing the correct analytical technique in aroma analysis.** In: Flavour in food. VOILLEY, A. & ETIÉVANT, P. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, p.81-95, 2006.

RETAMAR, J. A. Variaciones fitoquímicas de la especie *Lippia alba* (salvia morada) y sus aplicaciones en la química fina. **Essenze Derivati Agrumari**, v. 16, p. 55-60, 1994.

RICCIARDI, G.A.L.; RICCIARDI, A.I.A.; BANDONI, A.L. Fitoquímica de Verbenáceas (*Lippias* e *Aloysias*) del nordeste argentino. **Corriente: Universidad Nacional Del Nordeste (Comunicaciones científicas e tecnológicas)** 4p, 2000.

ROSSATO, M.; SANTOS, A.C.A. dos; SERAFINI, L.A.; AGOSTINI, F.; PANSERA, M.R.; WASUM, R.; BARBIERI, R.L. Avaliação do Óleo Essencial de *Aloysia sellowii* (Briquet) Moldenque (Verbenaceae) Sul do Brasil. **Química Nova**, v.29, n. 02, 2006.

SALIMENA, F.R.G.; MULGURA, M. *Lippia* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15171>>. Acesso em: 08 Dez. 2015.

SANTOS, A.S.; ALVES, S.M.; FIGUEIRÊDO, F.J.C.; ROCHA NETO, O.G. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. [**Embrapa Amazônia Oriental. Comunicado Técnico, 99**], Embrapa Amazônia Oriental, Belém. 6p, (2004).

SCARPA, G.F., Medicinal plants used by the criollos of Northwestern Argentine Chaco. **Journal of Ethnopharmacology**. v.91, p.115-135, 2004.

SENA FILHO, J.G.; MELO, J.G.S.; SARAIVA, A.M.; GONÇALVES, A.M.; PSIOTTANO, M.N.C.; XAVIER, H.S. Antimicrobial activity and phytochemical profile from the roots of *Lippia Alba* (Mill.) N. E. Brown. **Brazilian J. of Pharmacognosy**, v.16 (4), p.506-509, 2006.

SIANI, A.C. et al. Linalool from *Lippia alba*: study of the reproducibility of the essential oil profile and the enantiomeric purity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, p.3518-21, 2002.

SILVA SANTOS, A. Análise Técnica, Econômica e de Tendências da Indústria Brasileira de Óleos Essenciais. Rio de Janeiro: CD: Papel Virtual Editora, 2002.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2003. p. 467-495.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In SIMÕES, C.M.O (Coord).

SOARES, L. **Estudo tecnológico, fitoquímico e biológico de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown ex britt. & wils. (Falsa-melissa) verbenaceae**. 2001. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

STASHENKO EE, JARAMILLO BE, MARTINEZ JR: Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity, **J Chromatogr A** v.1025,p. 93–103, 2004.

TAVARES ES, JULIÃO LS, LOPES D, BIZZO HR, LAGE CLS, LEITÃO SG: Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Rev Bras Farmacogn** v.15, p.1–5, 2005.

VERBEL, J.O.; CERVERA, T.G.; FERNANDEZ, J.G.; COLORADO, B.J.; STASHENKO, E. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. Composição química e atividade antioxidante de óleos essenciais isolados de plantas da Colômbia. **Rev. bras. farmacogn.** v. 20 n. 4, 2010.

VIANA, G.S.B.; DO VALE, T.G.; RAO, V.S.N.; MATOS, F.J.A. Analgesic and antiinflammatory effects of two chemotypes of *Lippia alba* :A comparative study. **Pharm. Biol.** v.36, p.347-351, 1998.

VIT, P.B.; SILVA P. MELÉNDEZ. 2002. *Lippia alba* N.E. Brown Ficha botânica de interés apícola en Venezuela No.2 Cidrón. **Rev. Fac. Farm** v.43,p. 13-14.

WICHTEL, M. Teedrogen and Phytopharmaka. Stultgart. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2002.

YAMAMOTO, P. **Interação Genótipo X ambiente na produção e composição de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown**. 2006. Tese (Doutorado), Universidade de Campinas, Campinas, 2006.

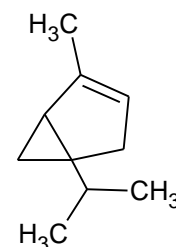
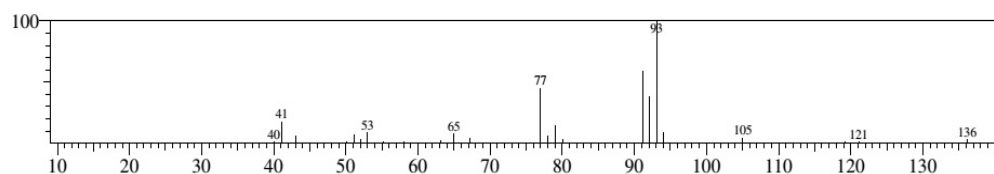
ZAMORA-MARTINEZ, M.C.; NIETO DE PASCUAL, C. Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Veracruz, Mexico. **Journal of Ethnopharmacology**, v.35, p.229-257, 1992.

ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SANTOS, A. S.; SILVA, M. H. L.; MAIA, J. G. S.; **Flavour Fragr. J.**, 13, p 47, 1998.

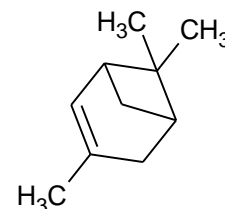
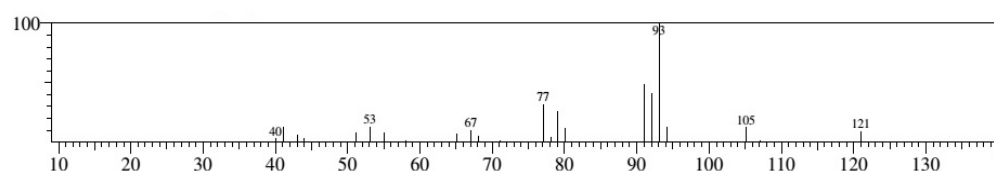
APÊNDICE A

Espectros de massa fornecidos por análise em CG-EM realizadas em cromatógrafo à gás (CG-EM) Shimadzu QP-2010 dos compostos identificados.

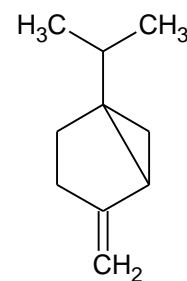
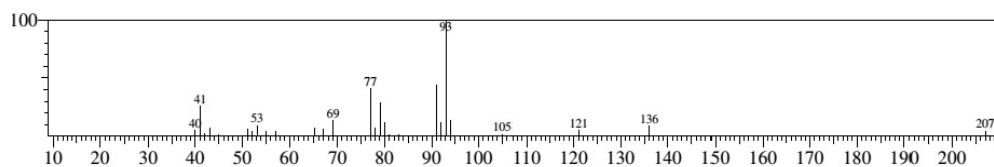
α -tujeno



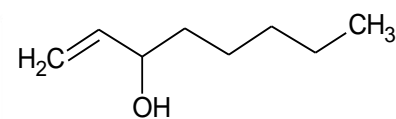
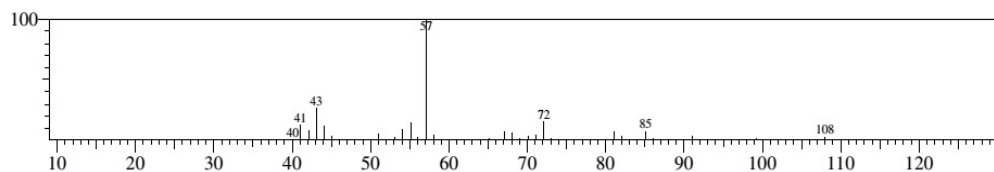
α -pineno



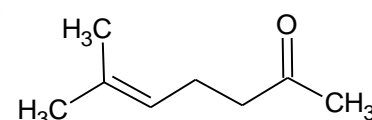
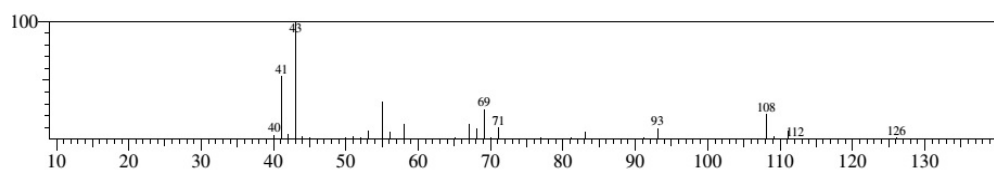
sabineno

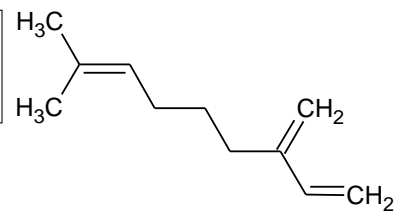
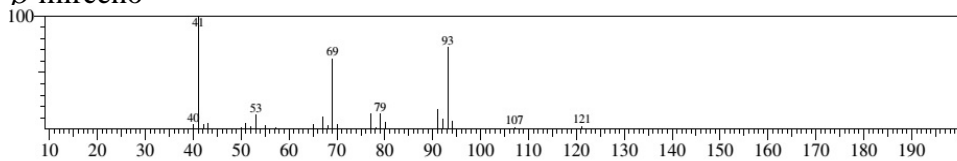


1-octen-3-ol

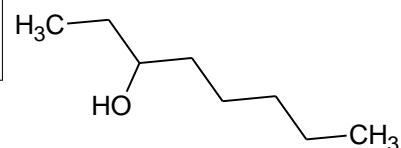
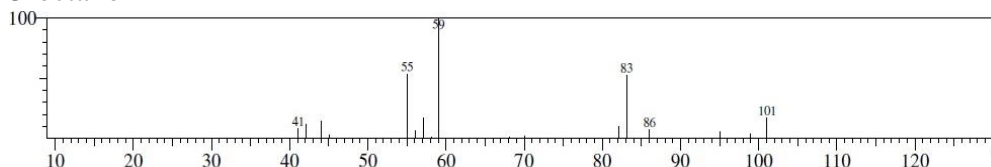


6-metil-5-heptenona

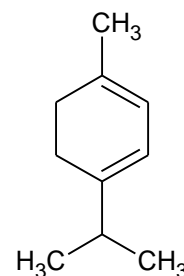
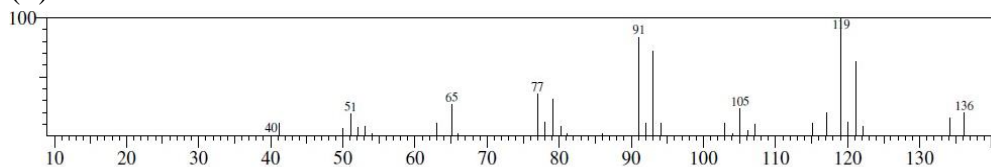
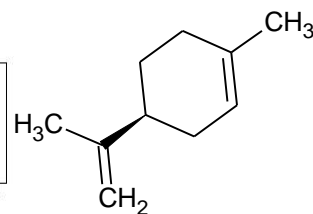
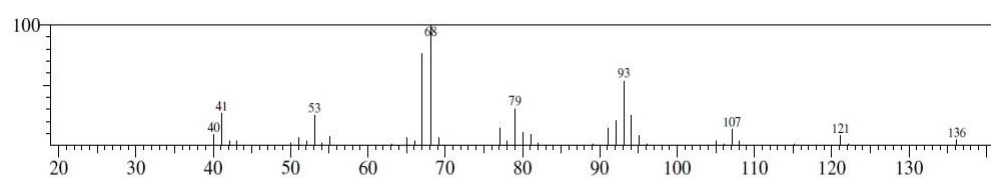
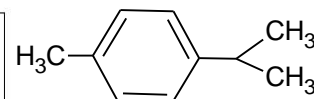
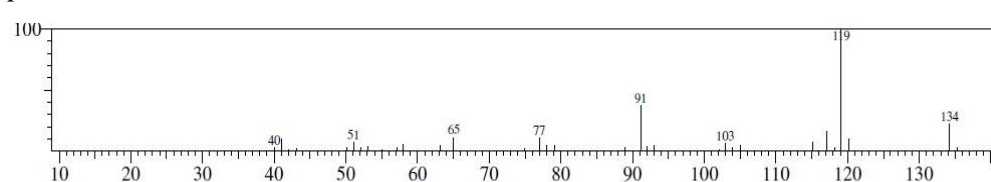


β -mirceno

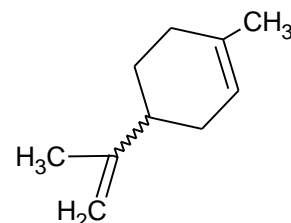
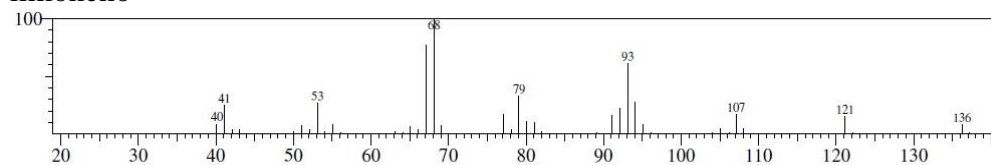
3-octanol



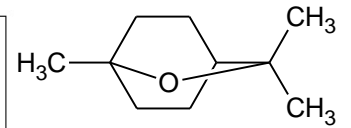
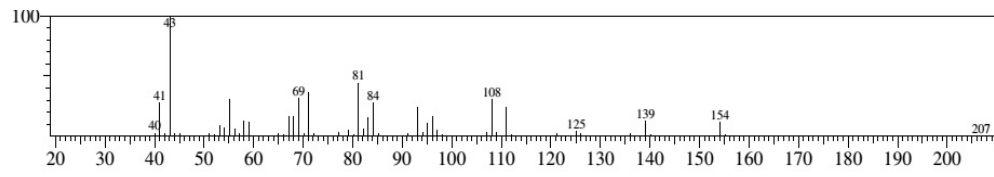
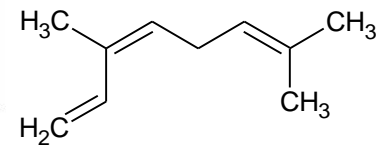
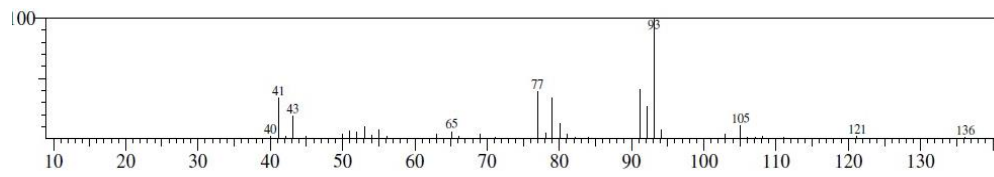
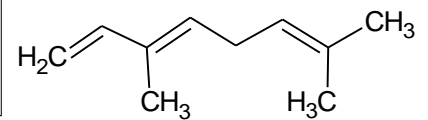
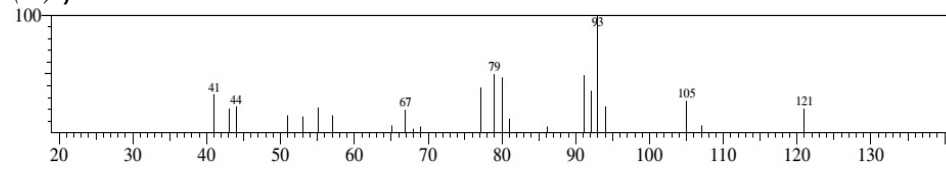
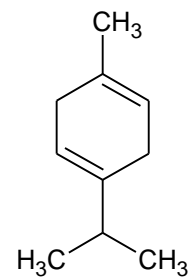
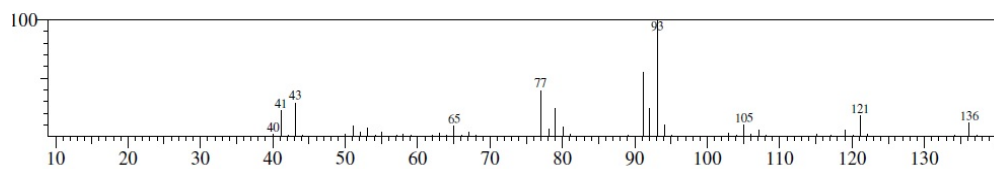
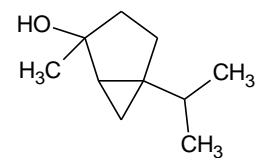
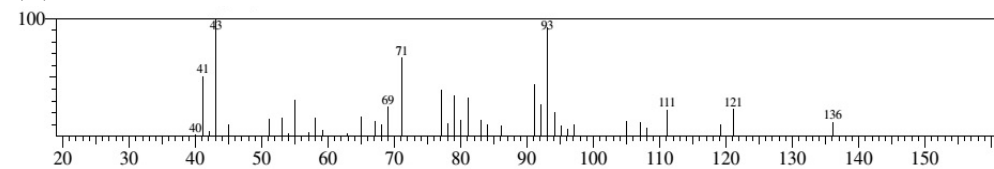
(S)-limoneno

 α -terpineno*p*-cimeno

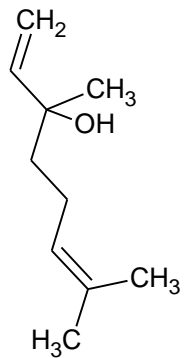
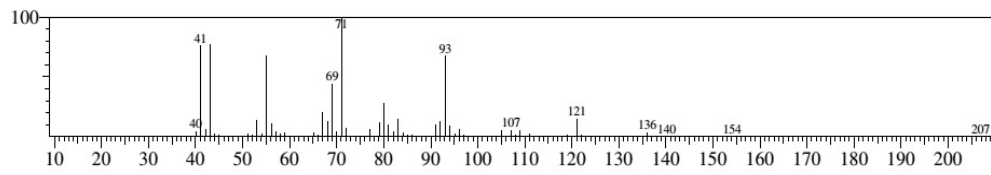
limoneno



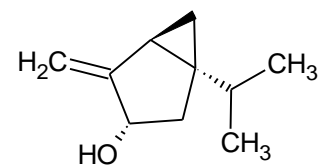
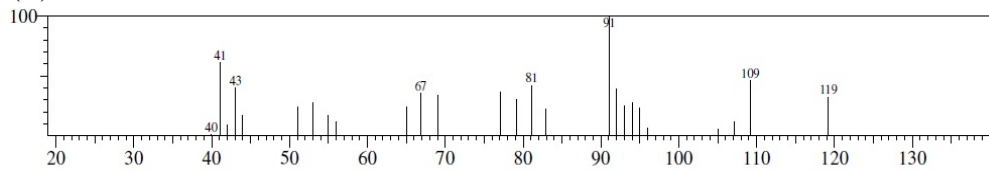
eucaliptol

 β -(Z)-ocimeno (E) - β -ocimeno γ -terpineno (Z) -hidrato de sabineno

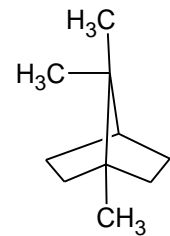
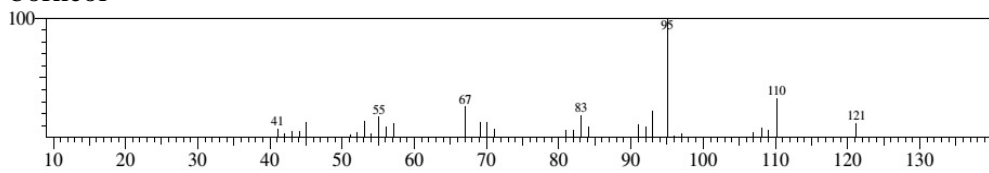
linalol



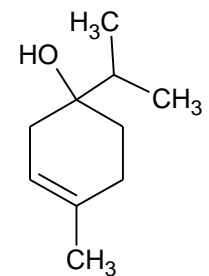
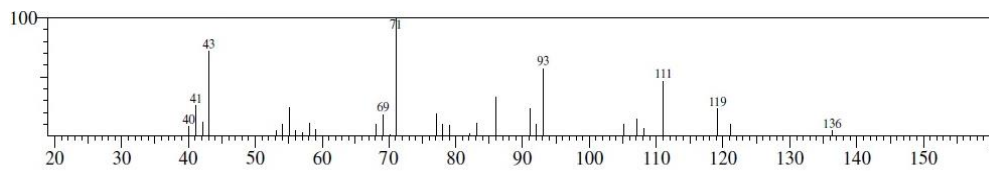
(Z)-sabinol

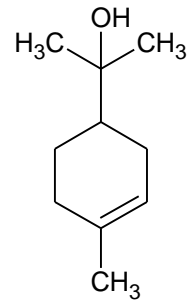
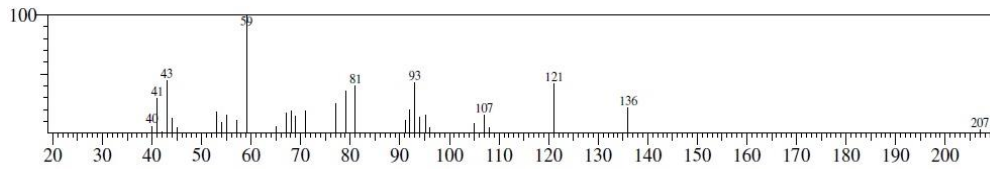


borneol

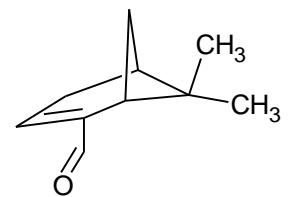
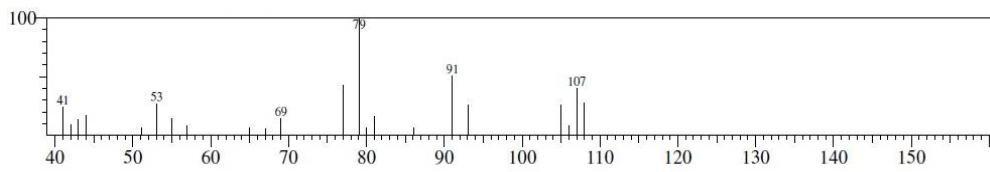
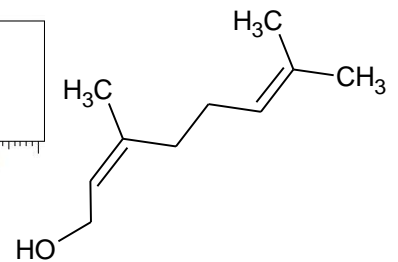
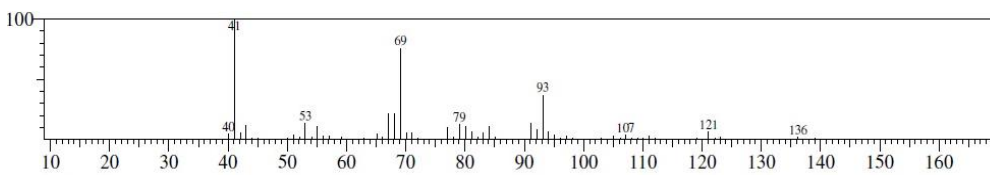


terpinen-4-ol

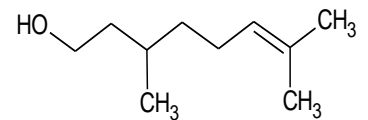
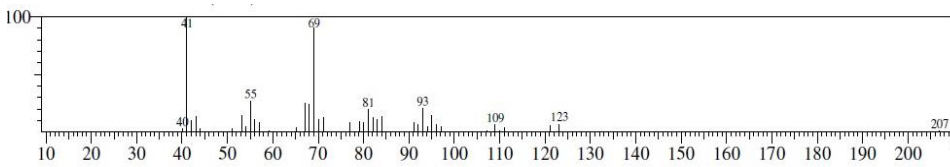
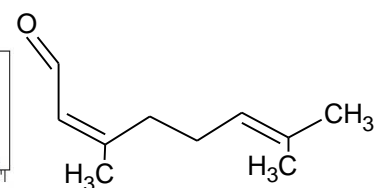
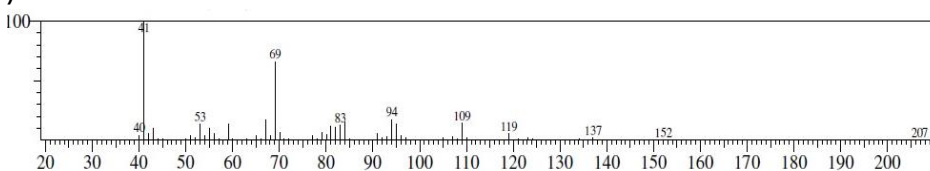


α -terpineol

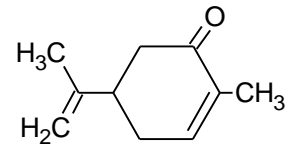
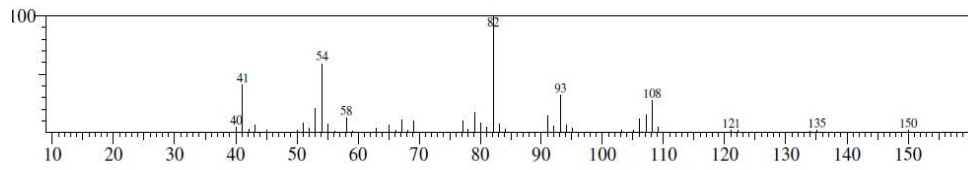
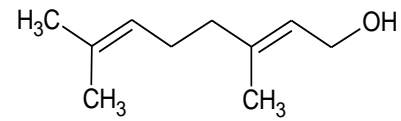
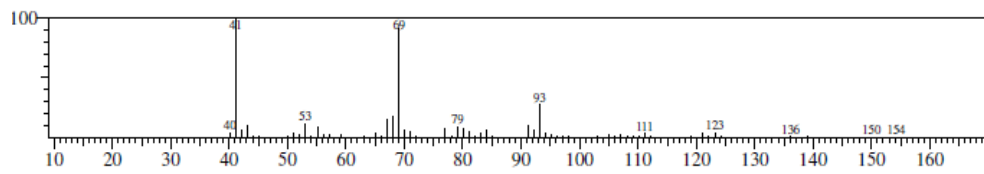
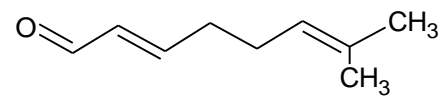
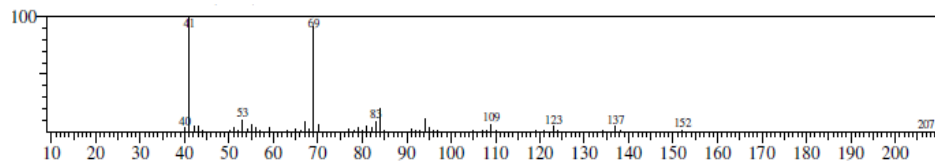
mirtenal

*(Z)*-geraniol

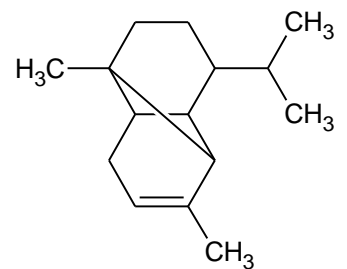
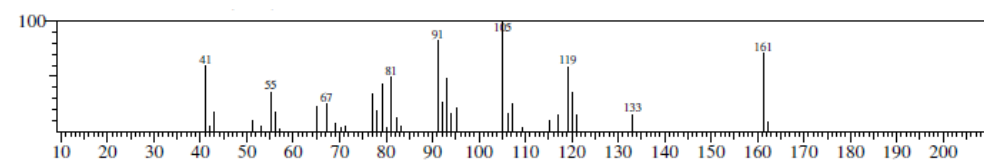
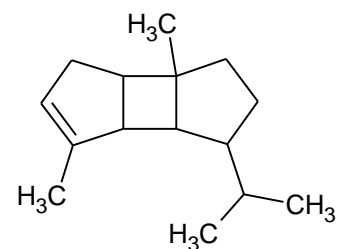
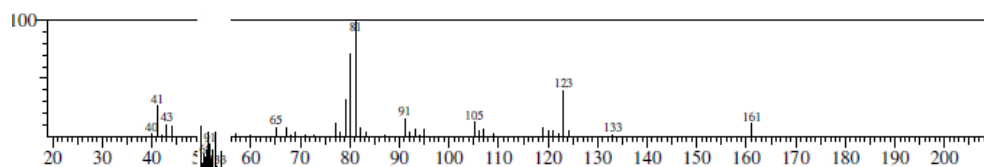
citronelol

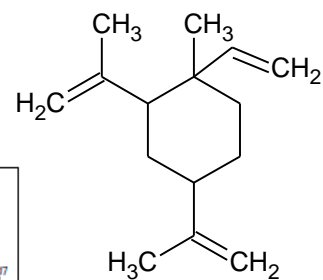
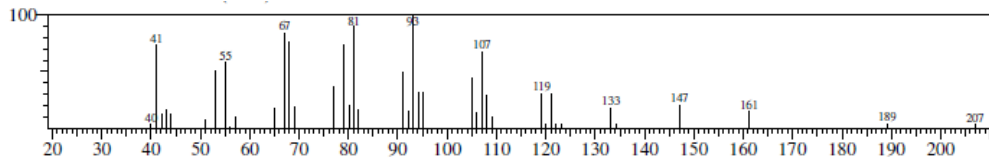
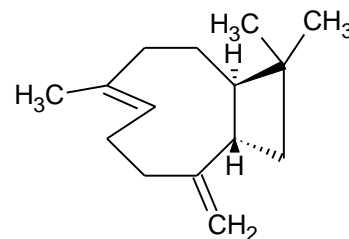
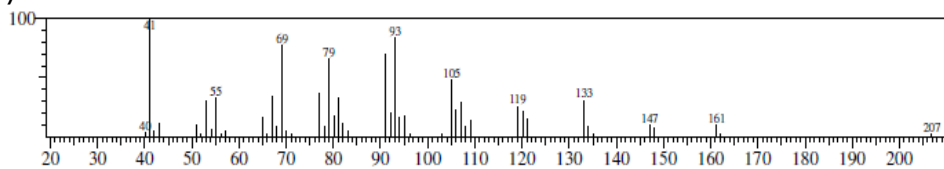
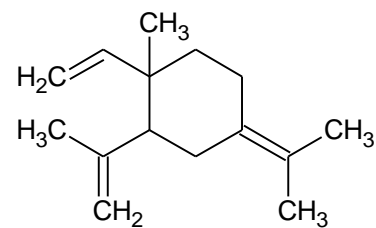
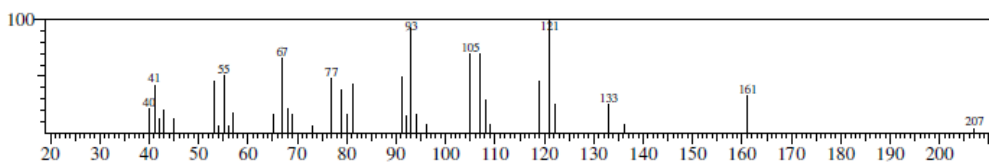
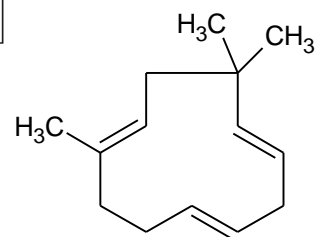
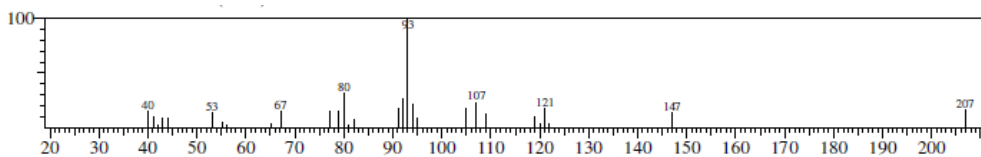
 β -citral

carvona

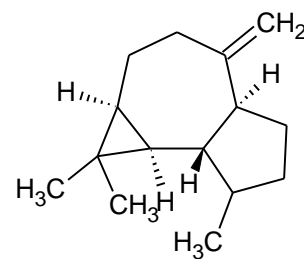
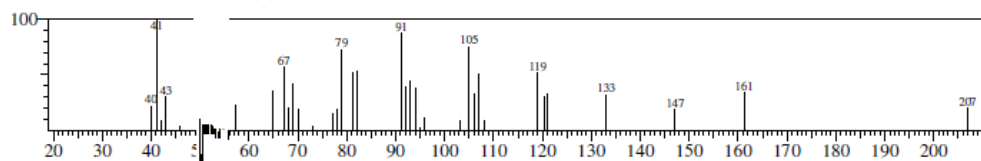
*(E)*-geraniol α -citral

copaeno

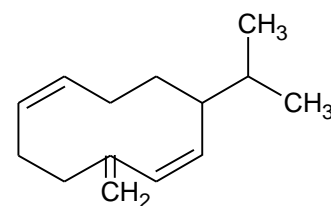
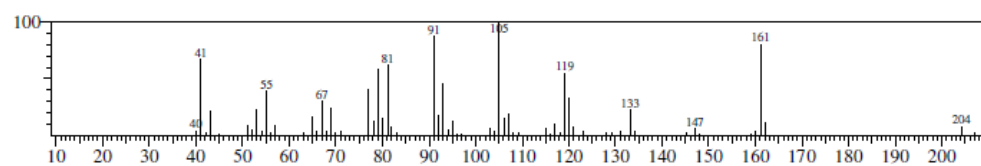
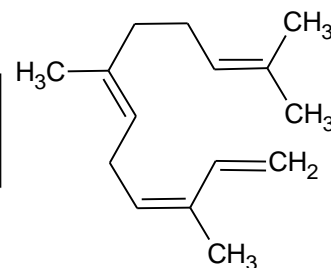
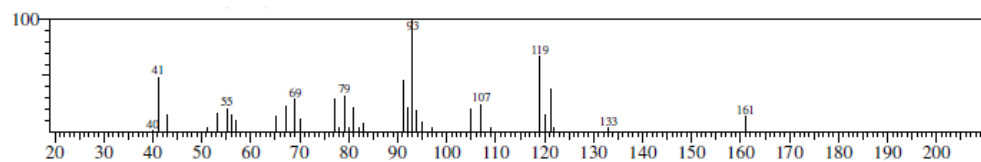
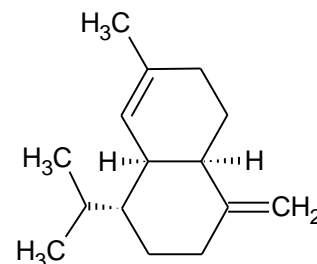
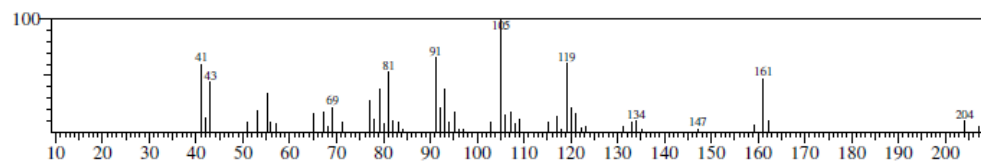
 α -bourboneno

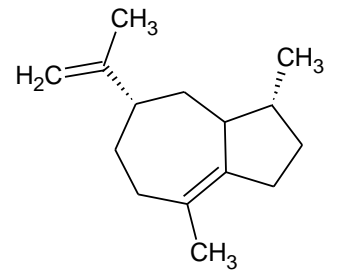
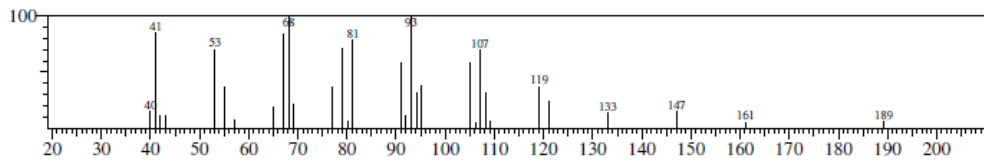
β -elemeno β -cariofileno γ -elemeno α -cariofileno

aromandendreno

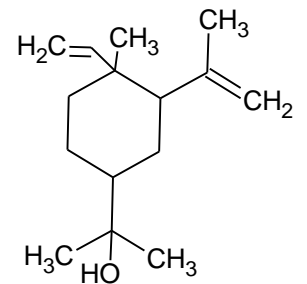
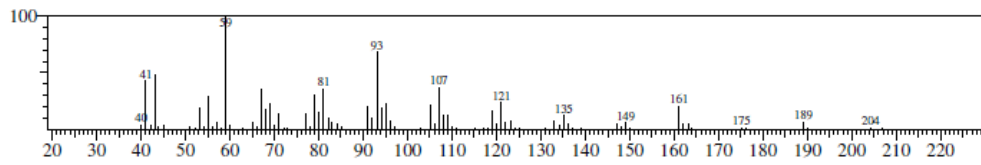


Germacreno D

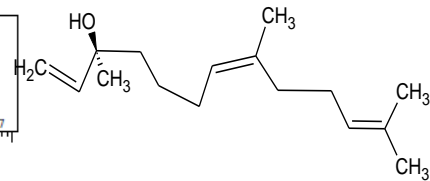
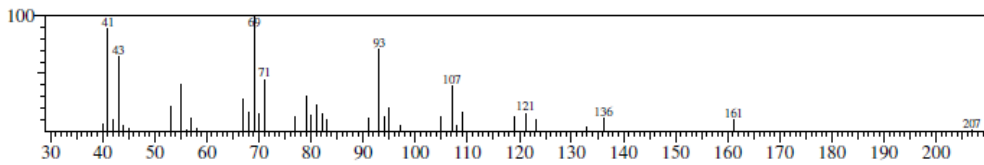
(Z,E)- α -farneseno γ -muuroleno

δ -guaieno

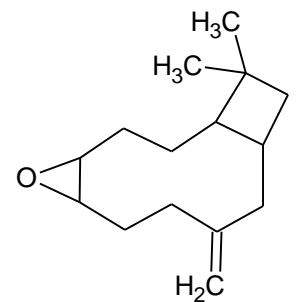
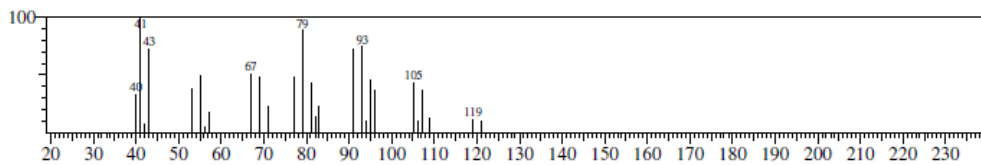
elemol



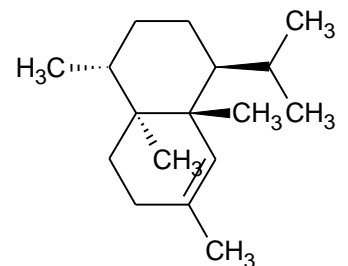
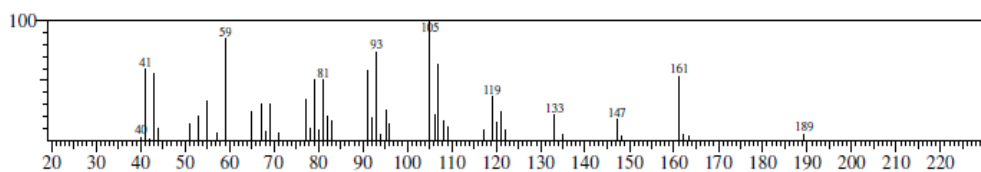
Nerolidol



óxido de cariofileno



cubenol



β -eudesmol