

## MELISSA, folha

### *Melissae folium*

A droga vegetal consiste de folhas secas de *Melissa officinalis* L., contendo, no mínimo, 4,0% de derivados hidroxicinâmicos totais e, no mínimo, 2,0% de ácido rosmarínico (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>, 360,31) e, no mínimo, 0,6% de óleo volátil.

### CARACTERÍSTICAS

As folhas amassadas têm odor forte, aromático, semelhante ao citral.

### IDENTIFICAÇÃO

#### A. Descrição macroscópica

Folhas inteiras, membranáceas, rugosas, quebradiças, pecioladas, verde-escuras e brilhantes na face adaxial e verde-claras na face abaxial, às vezes vináceas, principalmente na região próxima ao pecíolo e sobre as nervuras da face abaxial, com tricomas tectores e raros glandulares na face adaxial e com numerosos tricomas tectores e glandulares na face abaxial, estes últimos parecendo pequenos pontos, visíveis com lente de aumento de seis vezes; venação camptódroma-reticulódroma. Lâmina ovalada a ovalado-cordiforme, com base ovalada, arredondada ou cordiforme, ápice obtuso e margem irregularmente crenado-serrada, finamente ciliada, medindo de 4 a 8 cm de comprimento e 3 a 5 cm de largura. Pecíolo de 0,3 a 5,0 cm de comprimento, verde ou vináceo, côncavo na face adaxial, convexo na face abaxial e com duas costelas laterais; face adaxial coberta por longos tricomas tectores, os das costelas visíveis a olho nu.

#### B. Descrição microscópica

Lâmina foliar de simetria dorsiventral, anfi-hipoestomática, com estômatos diacíticos. Em vista frontal, as células da epiderme apresentam paredes anticliniais sinuosas. A lâmina foliar apresenta os seguintes tricomas: (1) tectores unicelulares, raramente bicelulares, cônicos a triangulares, dentiformes, curtos, de cutícula espessa e verrucosa; (2) tectores pluricelulares unisseriados, de três a cinco células, sendo a apical de ápice agudo, de aspecto uncinado, de cutícula espessa e verrucosa; (3) tectores pluricelulares unisseriados, de três a nove células, muito longos, de cutícula espessa e verrucosa; (4) tectores, pluricelulares unisseriados, de três a nove células, muito longos e de base alargada, formada por uma coroa de células; (5) glandulares de cabeça unicelular ou bicelular, arredondada e pedicelo unicelular a tricelular; (6) glandulares peltados, com pedicelo unicelular, localizado em depressão na epiderme e com cabeça secretora octocelular. Em secção transversal, a cutícula é levemente estriada e a epiderme é uniestratificada. O parênquima paliçádico é uniestratificado e o esponjoso é bi- a triestratificado; grãos de amido estão presentes em todos os tecidos. A nervura principal, em secção transversal, apresenta cutícula lisa na face adaxial e estriada na abaxial, a epiderme é uniestratificada, o colênquima é angular, uniestratificado junto à face abaxial e com três a quatro camadas junto à face adaxial. Ocorre um feixe colateral único, raro dois ou três, envolvido por uma endoderme contínua ou não. O pecíolo, em secção transversal, apresenta cutícula levemente estriada e epiderme uniestratificada. Os tricomas são os mesmos citados para a lâmina. O colênquima é angular e está distribuído em toda a extensão do pecíolo, uni- ou biestratificado na face adaxial e triestratificado na face abaxial; na região das costelas ocorrem até sete camadas. O sistema vascular é formado por três a cinco feixes colaterais, cada um deles envolvido por endoderme; o floema pode apresentar células pétreas junto às fibras.

### C. Descrição microscópica do pó

A amostra satisfaz a todas as exigências estabelecidas para a espécie, menos os caracteres macroscópicos. São características: coloração esverdeada; fragmentos de epiderme foliar com células de paredes anticlinais sinuosas e estômatos diacíticos e com cicatrizes dos tricomas tectores do tipo dentiforme; grande quantidade de tricomas conforme os descritos; fragmentos de mesofilo como descrito; cristais de oxalato de cálcio ausentes.

### D. Descrição macroscópica das impurezas

Os caules, ramos, flores e frutos da própria espécie, se presentes como impureza, caracterizam-se: caule quadrangular, piloso quando jovem; flores pequenas, estipitadas e protegidas por brácteas foliáceas, semelhantes às demais folhas; cálice pubescente, tubuloso-campanulado, bilabiado, lábio superior tridentado e inferior bífido; corola branca a amarelada ou rosada, com tubo recurvado e limbo com dois lobos desiguais, o superior ereto, bífido e o inferior estendido, trilobado, com lobos obtusos, sendo o mediano o mais longo; estames quatro, didínamos, coniventes sob o lábio superior da corola, anteras com tecas divergentes; ovário súpero, tetralobado, com lóculos monospermicos; estilete ginobásico, bífido; fruto tetraquênio, de coloração marrom.

### E. Descrição microscópica da impureza correspondente ao caule

Os caules da própria espécie, se presentes como impureza, apresentam, em estrutura primária, cutícula espessa e estriada, epiderme uniestratificada com células poliédricas, estômatos distribuídos próximos às costelas e localizados muito acima das demais células epidérmicas, muitos tricomas, mais comumente o tipo 6, além dos tipos 2 e 5 e os do tipo 4 distribuem-se nas costelas. O córtex apresenta colênquima angular distribuído por toda a extensão e mais desenvolvido nas costelas, clorênquima e parênquima cortical formado por células isodiamétricas com grandes espaços intercelulares. A endoderme possui grande quantidade de grãos de amido e envolve os quatro feixes colaterais. O parênquima medular é formado por células isodiamétricas de grande volume e de paredes delgadas. Em estrutura secundária, a epiderme e o córtex mantêm suas características, exceto a clara redução de tricomas e a comum ocorrência de células pétreas no parênquima cortical. O floema possui grande quantidade de fibras, o câmbio vascular é evidente e o xilema apresenta grande quantidade de grãos de amido. Esses grãos ocorrem em todos os tecidos, exceto na epiderme e em maior quantidade quando em estrutura secundária.

### F. Proceder conforme descrito em *Cromatografia em camada delgada* (5.2.17.1).

*Fase estacionária:* sílica-gel GF<sub>254</sub> (0,250 mm).

*Fase móvel:* hexano e acetato de etila (90:10).

*Solução amostra:* transferir cerca de 2 g da droga pulverizada para balão de fundo redondo de 250 mL, adicionar 100 mL de água. Adicionar 0,5 mL de xileno no tubo graduado e destilar durante uma hora conforme descrito em *Determinação de óleos voláteis em drogas vegetais* (5.4.1.6). Após a destilação, transferir a fase orgânica para um balão aferido de 1 mL, lavar o tubo graduado do aparelho com um pouco de xileno, completar o volume com o mesmo solvente e homogeneizar.

*Solução referência:* diluir 1 µL de citronelal e 10 µL de citral em xileno, num balão volumétrico de 25 mL, completar o volume e homogeneizar.

**Procedimento:** aplicar na cromatoplaca, separadamente, em forma de banda, 20 µL da *Solução amostra* e 10 µL da *Solução referência*. Desenvolver o cromatograma. Remover a cromatoplaca e deixar secar ao ar. Em seguida, nebulizar a placa com solução de anisaldeído e aquecer em estufa entre 100 °C e 105 °C, durante 10 a 15 minutos.

**Resultados:** no esquema a seguir há as sequências de zonas obtidas com a *Solução referência* e a *Solução amostra*. Outras zonas podem, ocasionalmente, aparecerem.

<i>Parte superior da placa</i>	
Citronelal: zona de coloração violeta-acinzentada	Zona de zona de coloração violeta-acinzentada
	Zona de zona de coloração violeta-avermelhado
Citral: zona de coloração violeta-azulada	Zona de zona de coloração violeta-azulada
<i>Solução referência</i>	<i>Solução amostra</i>

## TESTES

**Matéria estranha (5.4.1.3).** No máximo 10,0% de caules e flores.

**Água (5.4.1.4).** No máximo 10,0%. Determinar em 1 g da amostra pulverizada (355 µm), em estufa entre 100 °C e 105 °C, durante duas horas.

**Cinzas totais (5.4.1.5.1).** No máximo 12,0%.

**Contagem do número total de micro-organismos mesófilos (5.5.3.1.2).** Cumpre o teste.

**Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3).** Cumpre o teste.

**Metais pesados (5.4.5).** Cumpre o teste.

**Resíduos de agrotóxicos (5.4.3).** Cumpre o teste.

**Perfil cromatográfico.** Proceder conforme descrito em *Cromatografia a gás (5.2.17.5)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector por ionização de chama, utilizando mistura de nitrogênio, ar sintético e hidrogênio (1:1:10) como gases auxiliares à chama do detector; coluna capilar de 30 m de

comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, revestida com polidifenildimetilsiloxano, com espessura do filme de 0,25 µm. Utilizar hélio a uma pressão de 80 kpa como gás de arraste; fluxo do gás de arraste de 1 mL/minuto.

**Temperatura:**

	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)
Coluna	0 – 80	60 → 300
Injetor		220
Detector		250

**Solução amostra:** diluir o óleo volátil na razão de 2:100 em éter etílico.

**Procedimento:** injetar volume de 1 µL da *Solução amostra* no cromatógrafo a gás, utilizando divisão de fluxo de 1:50. Os índices de retenção linear dos constituintes do óleo são calculados em relação a uma série homóloga de hidrocarbonetos e comparados com amostras referência. Determinar as concentrações relativas por integração manual ou eletrônica pelo método de normalização. Calcular o Índice de Retenção Relativo, segundo a expressão:

$$IRR = 100 \times n + \frac{100 \times (tr_x - tr_z)}{(tr_{z+1} - tr_z)}$$

em que,

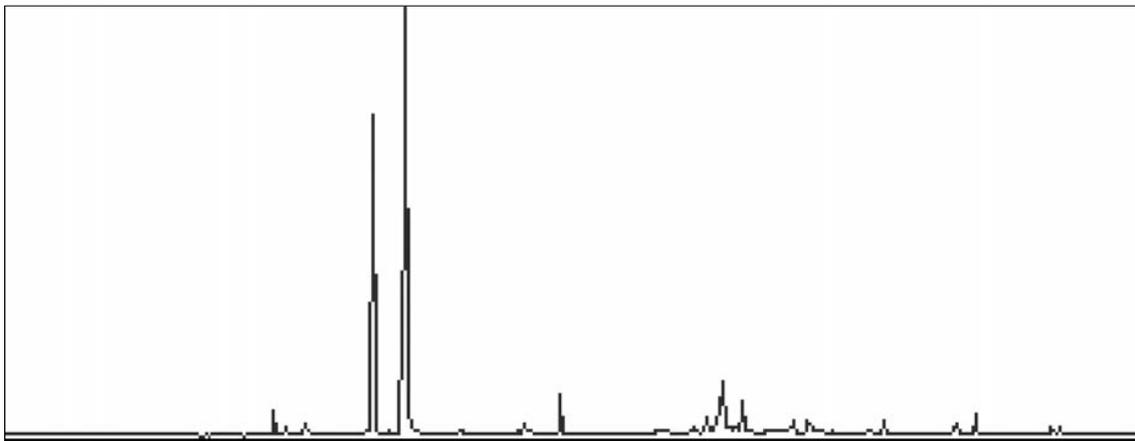
IRR = Índice de Retenção Relativo;

n = número de átomos de carbono do alcano de menor peso molecular;

tr<sub>x</sub> = tempo de retenção do constituinte “x” (intermediário a tr<sub>z</sub> e tr<sub>z+1</sub>);

tr<sub>z</sub> = tempo de retenção do alcano com “n” carbonos;

tr<sub>z+1</sub> = tempo de retenção do alcano com “n + 1” carbonos.



**Figura 1** – Cromatograma ilustrativo obtido com o óleo volátil de *Melissa officinalis* L., por cromatografia à gás acoplada a detector por ionização de chama.

No cromatograma obtido com a *solução amostra* verificar a presença dos componentes conforme segue:

Pico	Índice de Retenção	Constituinte	Teor (%)
1	1234	neral (citral B)	30,4 – 32,9
2	1265	geranial (citral A)	49,0 – 53,3
3	1404	beta-cariofileno	2,6 – 3,1

## DOSEAMENTO

**Derivados hidroxicinâmicos totais**

Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no visível (5.2.14)*. Preparar as soluções descritas a seguir.

*Solução estoque*: pesar, com exatidão, cerca de 0,2 g da droga pulverizada e transferir para balão de fundo redondo. Acrescentar 190 mL de álcool etílico a 50% (v/v) e aquecer em banho-maria, sob refluxo, durante 30 minutos. Esfriar e filtrar. Lavar o filtro com 10 mL de álcool etílico a 50% (v/v). Transferir o filtrado e a solução de lavagem para balão volumétrico de 200 mL, completar o volume com álcool etílico a 50% (v/v) e homogeneizar.

*Solução amostra*: em um balão volumétrico de 10 mL, transferir 1 mL da *Solução estoque*, 2 mL de ácido clorídrico 0,5 M, 2 mL de uma solução preparada dissolvendo 10 g de nitrito de sódio e 10 g de molibdato de sódio em 100 mL de água e, a seguir, 2 mL de hidróxido de sódio 2 M, completar o volume para 10 mL com água e homogeneizar.

*Solução branco*: em um balão volumétrico de 10 mL, transferir 1 mL da *Solução estoque*, 2 mL de ácido clorídrico 0,5 M, 2 mL de hidróxido de sódio 2 M, completar o volume para 10 mL com água e homogeneizar.

*Procedimento*: medir a absorvância da *Solução amostra* em 505 nm, após o seu preparo, utilizando a *Solução branco* para o ajuste do zero. Calcular o teor de derivados hidroxicinâmicos totais, expressos em ácido rosmarínico, em porcentagem, segundo a expressão:

$$\text{TDHC} = \frac{A \times 2000}{m \times 400}$$

em que,

TDHC = teor de derivados hidroxicinâmicos totais, expressos em ácido rosmarínico % (p/p);

A = absorvância medida para a *Solução amostra*;

2000 = fator de diluição;

400 = coeficiente de absorção específica do ácido rosmarínico;

m = massa em gramas da amostra utilizada, considerando a perda por dessecação.

**Ácido rosmarínico**

Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 332 nm; pré-coluna empacotada com sílica octadecilsilanizada, coluna de 150 mm de comprimento e 3,9 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica octadecilsilanizada (4 µm), mantida a temperatura ambiente; fluxo da *Fase móvel* de 0,6 mL/minuto.

*Eluente (A)*: água e ácido trifluoracético (100:0,1).

*Eluente (B)*: acetonitrila e ácido trifluoracético (100:0,1).

<i>Tempo (minutos)</i>	<i>Eluente (A) %</i>	<i>Eluente (B) %</i>	<i>Eluição</i>
0 – 14	90→61	10→39	gradiente linear
14 – 16	61→50	39→50	gradiente linear
16 – 18	50→90	50→10	gradiente linear
18 – 23	90	10	Isocrática

*Solução amostra:* pesar, com exatidão, cerca de 0,1 g da droga seca e pulverizada (800 µm) (5.2.11) e colocar em tubo de centrifuga fechado. Adicionar 5 mL de álcool etílico a 40% (v/v) e levar ao banho de ultrassom durante 10 minutos. Centrifugar por cinco minutos a  $42 \times g$ . Separar e transferir o sobrenadante para balão volumétrico de 10 mL. Extrair novamente o resíduo da droga com 4 mL de álcool etílico a 40% (v/v) em banho de ultrassom durante cinco minutos. Centrifugar e transferir o sobrenadante para o mesmo balão volumétrico, completar o volume para 10 mL com álcool etílico a 40% (v/v) e homogeneizar. Diluir 50 µL da solução resultante em 0,3 mL de água. Filtrar em unidade filtrante de 0,45 µm.

*Solução estoque:* dissolver 10 mg de ácido rosmarínico em álcool metílico, transferir, quantitativamente, para balão volumétrico de 10 mL, completar o volume com álcool metílico e homogeneizar.

*Soluções para curva analítica:* diluir uma alíquota de 200 µL da *Solução estoque* de modo a obter solução a 0,25 mg/mL. Realizar diluições da solução anterior, em álcool metílico, de modo a obter concentrações de 7,80 µg/mL, 15,60 µg/mL, 31,25 µg/mL, 62,50 µg/mL, 125 µg/mL e 250 µg/mL. Filtrar em unidade filtrante de 0,45 µm.

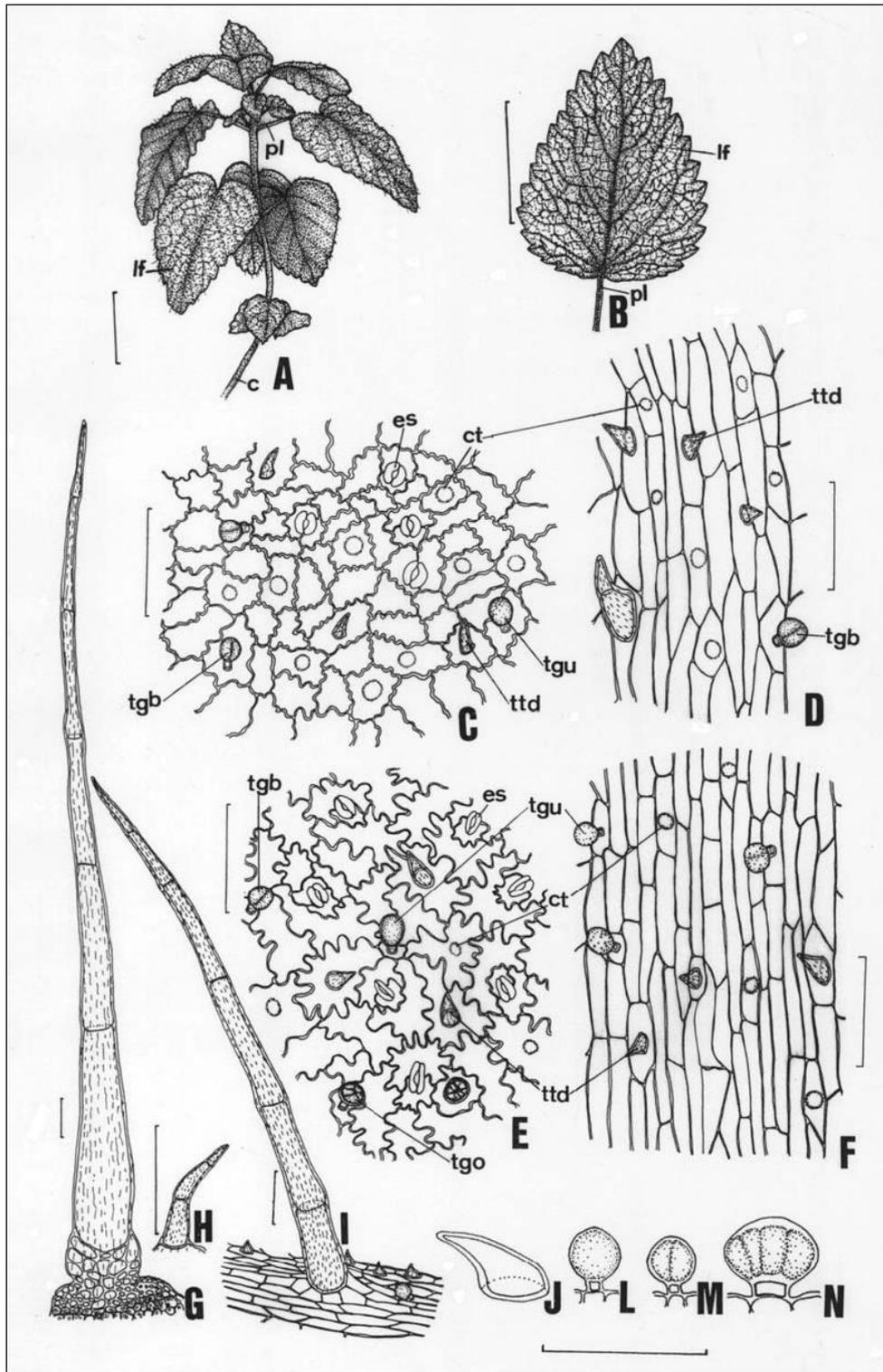
*Procedimento:* injetar, separadamente, 10 µL das *Soluções para curva analítica* e 10 µL da *Solução amostra*. Registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos. O tempo de retenção é de aproximadamente 10,3 minutos para o ácido rosmarínico. Calcular o teor de ácido rosmarínico na amostra a partir da equação da reta obtida com a curva de calibração. O resultado é expresso pela média das determinações em gramas de ácido rosmarínico, em porcentagem, considerando a perda por dessecação.

## Óleos voláteis

Proceder conforme descrito em *Determinação de óleos voláteis em drogas vegetais* (5.4.1.6). Utilizar balão de 1000 mL contendo 500 mL de água como líquido de destilação. Adicionar 0,5 mL de xileno no tubo graduado. Utilizar planta seca rasurada e não contundida. Proceder imediatamente à determinação do óleo volátil, a partir de 20 g da droga rasurada. Destilar durante quatro horas. Medir o volume e expressar o rendimento por 100 g de droga (v/p).

## EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipiente hermeticamente fechado ao abrigo da luz e do calor.



**Figura 2** – Aspectos macroscópicos, microscópicos e microscópicos do pó em *Melissa officinalis* L.

As escalas correspondem em **A e B** a 3 cm; em **C, D, E, F, G, H, I, J, L, M e N** a 100  $\mu\text{m}$ . **A** – aspecto geral de um ramo: caule (c); lâmina foliar (lf); pecíolo (pl). **B** – detalhe da face adaxial de uma folha: lâmina foliar (lf); pecíolo (pl). **C** – detalhe de uma porção da face adaxial da lâmina foliar, na região do intercostal, em vista frontal: cicatriz do tricoma tector do tipo dentiforme (ct); estômato (es); tricoma glandular com cabeça bicelular, tipo 5 (tgb); tricoma glandular com cabeça unicelular, tipo 5 (tgu); tricoma tector do tipo dentiforme, tipo 1 (ttd). **D** – detalhe de uma porção da face adaxial da lâmina foliar, sobre a nervura principal, em vista frontal: cicatriz do tricoma tector do tipo dentiforme, tipo 1 (ct); tricoma glandular com cabeça bicelular, tipo 5 (tgb); tricoma tector do tipo dentiforme, tipo 1 (ttd); tricoma glandular com cabeça unicelular, tipo 5 (tgu). **E** – detalhe de uma porção da face abaxial da lâmina foliar, na região intercostal, em vista frontal: cicatriz do tricoma tector do tipo dentiforme, tipo 1 (ct); estômato (es); tricoma glandular com cabeça bicelular, tipo 5 (tgb); tricoma glandular com cabeça octacelular, tipo 6 (tgo); tricoma glandular com cabeça unicelular, tipo 5 (tgu); tricoma tector do tipo dentiforme, tipo 1 (ttd). **F** – detalhe

de uma porção da face abaxial da lâmina foliar, sobre a nervura principal, em vista frontal: cicatriz do tricoma tector do tipo dentiforme, tipo 1 (ct); tricoma glandular com cabeça unicelular, tipo 5 (tgu); tricoma tector do tipo dentiforme, tipo 1 (ttd). **G** – detalhe de um tricoma tector pluricelular unisseriado, com coroa de células basais, tipo 4, em vista lateral. **H** – detalhe de um tricoma tector pluricelular unisseriado, de aspecto uncinado, tipo 2, em vista lateral. **I** – detalhe de um tricoma tector pluricelular unisseriado, tipo 3, em vista lateral. **J** – detalhe de um tricoma tector dentiforme, unicelular, tipo 1, em vista lateral. **L** – detalhe de um tricoma glandular de cabeça unicelular, tipo 5, em vista lateral. **M** – detalhe de um tricoma glandular de cabeça bicelular, tipo 5, em vista lateral. **N** – detalhe de um tricoma glandular, com cabeça secretora octocelular, tipo 6, em vista lateral.

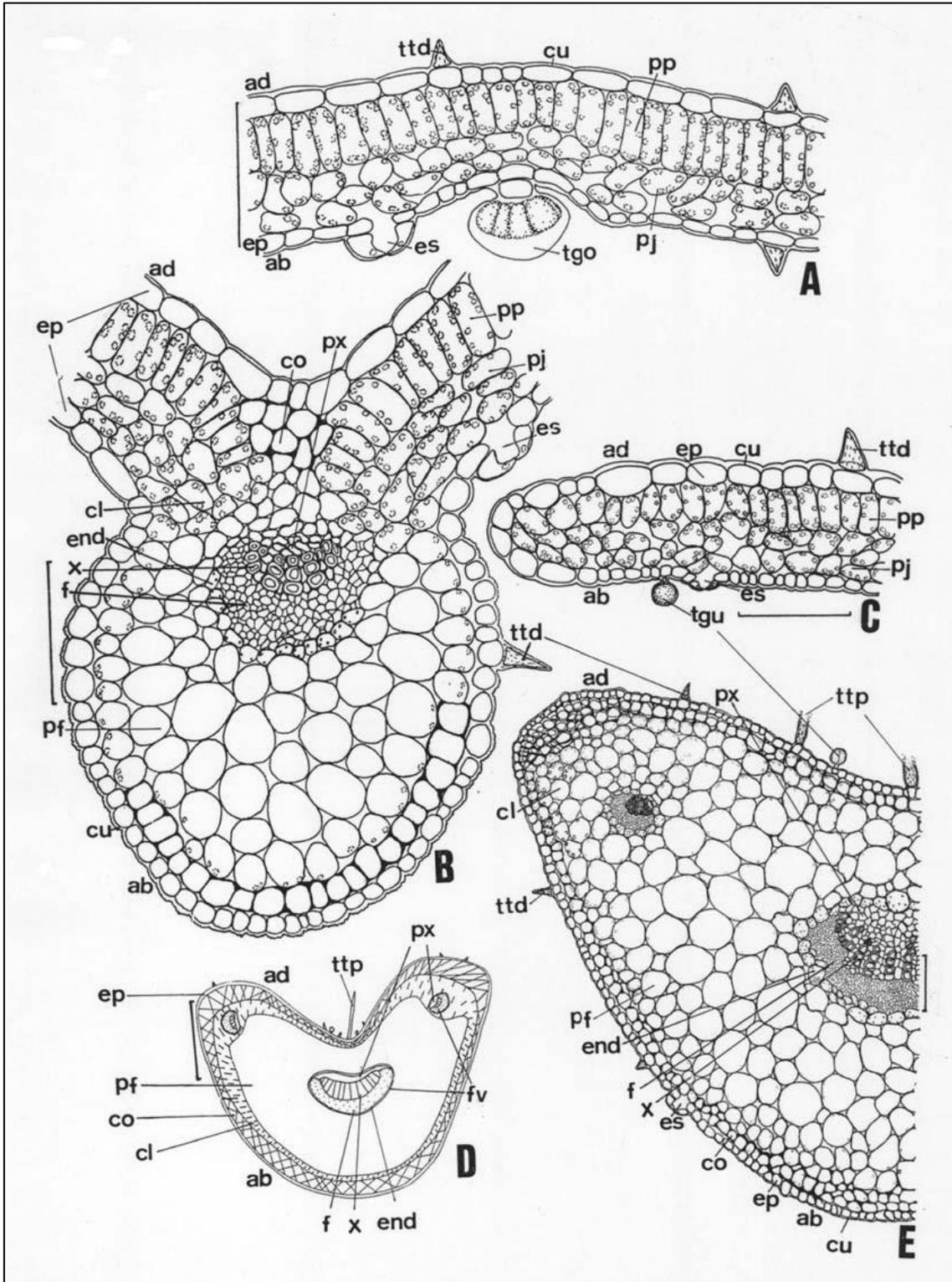


Figura 3 – Aspectos microscópicos em *Melissa officinalis* L.

As escalas correspondem em **A**, **B**, **C** e **E** a 100 µm; em **D** a 400 µm. **A** – detalhe de uma porção da região do mesofilo, em secção transversal: face abaxial (ab); face adaxial (ad); cutícula (cu); epiderme (ep); estômato (es); parênquima esponjoso (pj); parênquima paliçádico (pp); tricoma tector do tipo dentiforme, tipo 1 (ttt); tricoma glandular com cabeça octocelular, tipo 6 (tgo). **B** – detalhe da região da nervura principal e de porção do mesofilo, em secção transversal: face abaxial (ab); face adaxial (ad); clorênquima (cl); colênquima (co); cutícula (cu); endoderme (end); epiderme (ep); estômato (es); floema (f); parênquima esponjoso (pj); parênquima (p); parênquima paliçádico (pp); parênquima do xilema (px); tricoma tector do tipo dentiforme, tipo 1 (ttt); xilema (x). **C** – detalhe de uma porção do bordo foliar, em secção transversal: face abaxial (ab); face adaxial (ad); cutícula (cu); epiderme (ep); estômato (es); parênquima esponjoso (pj); parênquima paliçádico (pp); tricoma glandular com cabeça unicelular, tipo 5 (tgu); tricoma tector do tipo dentiforme, tipo 1 (ttt). **D** – representação esquemática do aspecto geral do pecíolo, em secção transversal: face abaxial (ab); face adaxial (ad); clorênquima (cl); colênquima (co); endoderme (end); epiderme (ep); floema (f); feixe vascular (fv); parênquima fundamental (pf); parênquima do xilema (px); tricoma tector pluricelular unisseriado, tipo 3 (ttt); xilema (x). **E** – detalhe de porção do pecíolo, em secção transversal: face abaxial (ab); face adaxial(ad); clorênquima (cl); colênquima (co); cutícula (cu); endoderme (end); epiderme (ep); estômato (es); floema (f); parênquima fundamental (pf); parênquima do xilema (px); tricoma glandular com cabeça bicelular, tipo 5 (tgu); tricoma tector do tipo dentiforme, tipo 1 (ttt); tricoma tector pluricelular unisseriado, tipo 3 (ttt), xilema (x).