



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA – DQB



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Hyptis martiusii* Benth.(LAMIACEAE)

ALLAN DEMÉTRIUS LEITE DE OLIVEIRA

Crato – CE

2011

ALLAN DEMÉTRIUS LEITE DE OLIVEIRA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Hyptis martiusii* Benth.(LAMIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Irwin Rose de Alencar

Co-orientador: Prof Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe

Crato – CE

2011

ALLAN DEMÉTRIUS LEITE DE OLIVEIRA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Hyptis martiusii Benth. (LAMIACEAE)**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Irwin Rose de Alencar-Orientador
Universidade Regional do Cariri-URCA

Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe- Co-orientador
Faculdade de Medicina do Juazeiro do Norte-FMJ

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho-Avaliador Interno
Universidade Regional do Cariri-URCA

Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo– Avaliador Externo
Universidade Federal de Sergipe-UFS

Dedico este trabalho aos meus pais, em especial a figura batalhadora e guerreira de minha mãe (*in memoriam*), a minha esposa, minha filha e as minhas irmãs por tudo o que eles representam em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo que Ele representa em nossas vidas, pela força que tem me concedido para continuar nessa jornada.

Aos meus pais, em especial a minha querida mãe, que sempre nos orientou de forma tão brilhante, mas infelizmente não está conosco pra compartilhar este momento de alegria.

A minha esposa Yara, pela paciência e apoio incondicional, e a minha filhinha, Maria Clara, agradeço pela sua existência e em me fazer tão feliz.

Ao meu orientador Prof. Dr. Irwin Rose de Alencar e ao Prof. Dr. Galberto pela cooperação intensa no desenvolvimento.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Cícero Felipe pela sua paciência, colaboração e orientações tão importantes.

A Prof. M.Sc. Fabíola Fernandes e Prof. M.Sc. Yana por terem destinado parte do seu precioso tempo me auxiliando em experimentos.

Ao Professor Aracélio pelo auxílio na realização das estatísticas.

Aos que contribuíram para que este trabalho fosse concluído, em especial a Rodolfo e Paula que tanto me auxiliaram.

Aos professores que compõem o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular pelo incentivo e pela imensa contribuição ofertada para o engrandecimento desse curso.

Aos meus colegas de mestrado, que acompanharam esse trajeto, sempre no incentivo mútuo, e também pela amizade e troca de informações, em especial a Rodrigo, Vanessa, Gerlânia, Carla, Ednardo e Erlânio.

A Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ pela concessão das linhagens de bactérias padrão.

Ao Hospital Universitário da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, pela concessão das linhagens de bactérias multirresistentes.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior - CAPES pelo fornecimento de recursos para elaboração deste trabalho.

A Universidade Regional do Cariri – URCA por ter contribuído para que todo este trabalho fosse possível.

A Universidade Federal do Piauí (UFPI) pela realização da prospecção química.

Aos Colegas do Laboratório de Farmacologia e Química – LFQM e do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais - LPPN, com os quais dividi vários momentos.

Agradeço a pessoa de Luiz Leandro da Silva (seu Luiz) pela ajuda nas coletas das espécies.

A Faculdade Leão Sampaio - FALS e as Faculdades Integradas de Patos - FIP, pelo apoio e pela compreensão nos momentos em que tive que me ausentar.

Aos coordenadores dos Cursos de Biomedicina da FALS (Prof. Ana Ruth) e das FIP, (Prof. Marcos Cezar) pelo apoio.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização e sucesso deste trabalho, agradeço pelo auxílio e por terem contribuído para este crescimento pessoal e profissional!

Muito obrigado!

Não te torne sábio aos teus próprios olhos. Teme a Deus e desvia-te do mal. Torne-se isso uma cura para o teu umbigo e refrigério para os teus ossos. Provérbios (3; 7,8)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1.0 INTRODUÇÃO	17
2.0 OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
3.1 Família <i>Lamiaceae</i>.....	24
3.2 Gênero <i>Hyptis</i>	24
3.3 O efeito farmacológico de substâncias extraídas de plantas sobre microorganismos diversos.....	26
3.4 Atividades farmacológicas da família <i>Lamiaceae</i>.....	29
3.4.1 Atividade antimicrobiana e antifúngica.....	29
3.4.2 Atividade hipocolesterolêmica e antiedematogênica.....	31
3.4.3 Atividade antiparasitária.....	32
3.4.4 Atividade antitumoral.....	32
3.5 Panorama dos constituintes químicos e atividade farmacológica de espécies do gênero <i>Hyptis</i>.....	33

3.6 Atualização sobre os constituintes químicos e atividade farmacológica da espécie <i>Hyptis martiusii</i> Benth.....	43
4.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1 Microorganismos (Bactérias e Fungos).....	47
4.2 Coleta do Material Vegetal.....	48
4.3 Extração do óleo essencial das folhas frescas de <i>Hyptis martiusii</i> Benth.....	48
4.4 Análise química do óleo essencial.....	50
4.5 Avaliação da atividade antibacteriana e concentração inibitória mínima (CIM)...	52
4.6 Avaliação da atividade moduladora por microdiluição	54
4.7 Avaliação da atividade moduladora do OEHm por contato gasoso.....	55
4.8 Análises estatísticas	58
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1 Análise da composição química do óleo essencial.....	60
5.2 Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método da microdiluição.....	64
5.3 Efeito modulador por contato direto.....	66
5.4 Efeito modulador por contato a vapor.....	69
5.5 Concentração inibitória mínima e efeito modulador antifúngico por contato direto.....	75
6.0 CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Síntese de metabólitos secundários do ác. Chiquímico.....	25
Figura 2: Folhas da espécie <i>Hyptis martiusii</i> Benth.....	26
Figura 3: Local da realização da coleta de folhas de <i>Hyptis martiusii</i> na Chapada do Araripe.....	48
Figura 4: Folhas de <i>Hyptis martiusii</i> coletadas na Chapada do Araripe.....	49
Figura 5: Aparelho tipo Clevenger modificado por Gottlieb.....	49
Figura 6: Fluxograma de extração do óleo essencial de <i>Hyptis martiusii</i> Benth.....	51
Figura 7: (A) Inoculação da suspensão bacteriana nos poços de microdiluição (B) Placa de microdiluição (C) Revelação com resazurina sódica.....	53
Figura 8: Microdiluição em placa.....	55
Figura 9: (A) Amicacina, Tobramicina e Gentamicina (B) Utilização dos antibióticos aminoglicosídeos (C) Halo de inibição.....	56
Figura 10: Fluxograma de realização de testes após a extração e identificação do óleo essencial.....	57

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Espécies de <i>Hyptis</i> , constituição química e respectivas atividades descritas nos últimos dez anos.....	34
QUADRO 2: Principais constituintes identificados em espécies de <i>Hyptis</i>	41
QUADRO 3: Espécie <i>Hyptis martiusii</i> , constituição química e respectivas atividades descritas nos últimos dez anos.....	44
QUADRO 4: Perfil de resistência das linhagens multirresistentes utilizadas nos ensaios antibacterianos.....	47
QUADRO 5 : Estruturas químicas dos constituintes majoritários presentes nos óleos essenciais das folhas de <i>Hyptis martiusii</i> Benth.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Constituição química do óleo essencial das folhas de <i>Hyptis martiusii</i> Benth...	62
Tabela 2. Atividade antibacteriana e Concentração inibitória mínima (CIM) do OEHm e de antimicrobianos padrões ($\mu\text{g/mL}$).....	65
Tabela 3. Avaliação da atividade moduladora do OEHm frente as linhagens bacterianas ($\mu\text{g/mL}$).....	68
Tabela 4: Modificação da atividade do antibiotico e constituintes voláteis do óleo essencial de <i>H. martiusii</i> por contato gasoso (mm).....	71
Tabela 5: Atividade antifúngica e Concentração inibitória mínima (CIM) do OEHm e de antifúngicos padrões ($\mu\text{g/mL}$).....	77
Tabela 6: Atividade moduladora do óleo essencial de <i>Hyptis martiusii</i>	77

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA- Análise de Variância

ATCC- *American Type Culture Collection*

BHI- *Brain Heart Infusion Broth*

°C- Grau Celsius

°C/min- Grau Celsius/min

CG/EM- Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

CIM- Concentração Inibitória Mínima

CLSI- *Clinical and Laboratory Standards Institute*

cm/seg- Centímetro por segundo

DMSO- Dimetilsulfóxido

eV- Eletrovolt

g- grama

i.d.- Indicativo de densidade

IR- Índice de Retenção

kPa- Quilopascal

m- Metro

mg/kg – Miligrama por quilograma

mm-Milímetro

m/z- Relação massa/carga

mL- Mililitro

mL/min- Mililitro por minuto

Na₂SO₄- Sulfato de sódio

OEHm- Óleo essencial de *Hyptis martiusii*

PCA- *Plate Count Agar*

PDA- Potato Dextrose Agar

UFC/ mL- Unidade Formadora de Colônias por mililitro

µg/ mL- Micrograma por mililitro

µL- Microlitro

µm- Micrômetro

RESUMO

O emprego de plantas medicinais na terapêutica remonta tempos históricos, que remetem às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers. O gênero *Hyptis*, constituído por mais de 300 espécies, exibe uma grande diversidade morfológica. O objetivo desta pesquisa foi verificar a composição química, avaliar a atividade antibacteriana, antifúngica e moduladora do óleo essencial extraído da espécie vegetal *Hyptis martiusii* Benth. O óleo essencial obtido forneceu um rendimento de 0,78% e sua análise por CG/EM permitiu a identificação de 24 constituintes representando 92,13%, com ocorrências exclusivas de mono e sesquiterpenóides. Os constituintes majoritários foram *trans*-cariofileno (9,21%) e biciclogermacreno (10,60%). Diferentes concentrações do óleo essencial de *Hyptis martiusii* foram testadas para atividade antibacteriana contra linhagens multiresistentes de *Escherichia coli* 27 e *Staphylococcus aureus* e as linhagens padrão para *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Observou-se que o crescimento de algumas linhagens bacterianas foi inibido. Os valores da concentração inibitória mínima (CIM) variaram de 64 a ≥ 512 $\mu\text{g/mL}$. Apenas uma das linhagens testadas não se mostrou sensível ao tratamento com o produto natural. Na avaliação da atividade moduladora por contato direto observou-se efeito antagônico frente à linhagem de *S. aureus* 358. Na avaliação dos testes antimicrobianos para contato gasoso, três antibióticos foram utilizados (amicacina, gentamicina e tobramicina). Contra cepas de *S. aureus* ATCC12692 percebeu-se o aumento do halo de inibição de todos os antimicrobianos utilizados, principalmente amicacina, com incremento de 328% na concentração de 50% do OEHm. Observou-se também que todas as concentrações testadas juntamente com o antimicrobiano tobramicina tiveram um efeito sinérgico. De todas as linhagens testadas a *S. aureus* (358) multiresistente e a *E. coli* ATCC25922 foram as que apresentaram resultados menos expressivos. As concentrações representativas para todos os antibióticos testados foram a de 50 e 25%. Sobre a linhagem de *B. cereus* ATCC33018 apresentou um efeito sinérgico mais evidente quando tratado na concentração de 50% e com os antimicrobianos amicacina e tobramicina. Na avaliação da atividade antifúngica observou-se tal efeito na realização da CIM, onde o efeito do OEHm frente as linhagens de *Candida albicans* ATCC40006 apresentaram resultados compatíveis com os antifúngicos utilizados (cetoconazol e fluconazol). Com os resultados obtidos, o óleo essencial de *Hyptis martiusii* Benth. (OEHm) mostrou-se um produto natural a ser explorado em pesquisas de ação antibacteriana e antifúngica.

Palavras chave: antibacteriano, antifúngico, composição química e *Hyptis martiusii*.

ABSTRACT

The use of medicinal plants in therapy dates from historical times, which descubed by the Holy Scriptures and the Ebers Papyrus. The genus *Hyptis*, comprised by over 300 species, exhibits a great morphological diversity. The objective of this research was to determine the chemical composition, to assess the antibacterial, antifungal and modulatory activities of *Hyptis martiusii* Benth. The essential oil yielded 0.78% and its analysis by GC/MS enabled the identification of 24 constituents, which represented 92.13%, with occurrences of mono and sesquiterpenoids only. The major constituents were trans-caryophyllene (9.21%), and bicyclogermacrene (10.60%). Different concentrations of *Hyptis martiusii* essential oil were tested for antibacterial activity against strains of multiresistant *Escherichia coli* 27 and *Staphylococcus aureus*, as well as the standard strains of *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa*. It was observed that the growth of some bacterial strains was inhibited. The values of minimum inhibitory concentration (MIC) ranged from 64 to ≥ 512 $\mu\text{g/mL}$. Only one of the strains tested was not sensitive to treatment with this natural product. The assessment of the modulatory activity by direct contact showed antagonistic effect against the strain 358 of *S. aureus*. In the evaluation of the antimicrobial activity by gaseous contact, three antibiotics (amikacin, gentamicin and tobramycin) were used. Against strains ATCC12692 of *S. aureus*, it was observed an increase of the zone of inhibition of all antimicrobials used, mainly amikacin, with an increase of 328% at the HmEO concentration of 50%. It was also observed that all concentrations tested in association with tobramycin presented a synergistic effect. Of all strains tested, multiresistant *S. aureus* (358) and *E. coli* ATCC25922 presented less significant results. The representative concentrations for all antibiotics tested were 50 and 25%. The strain ATCC33018 of *B. cereus* presented a more evident synergistic effect when treated at a concentration of 50% and with the antibiotics amikacin and tobramycin. The antifungal activity was observed in carrying out the minimum inhibitory concentration, in which the effect of HmEO against lines of *Candida albicans* ATCC40006 presented results consistent with those of the standard antifungals (ketoconazole and fluconazole) used. According to the data, the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. (HmEO) is a natural product to be exploited in antibacterial and antifungal research.

Keywords: antibacterial, antifungal, chemical composition and *Hyptis martiusii*.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As plantas têm sido utilizadas pelo homem desde tempos remotos, para curar doenças ou para atenuar seus sinais e sintomas. O emprego de plantas medicinais na terapêutica remonta às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers onde, o mesmo enumera cerca de 100 doenças descrevendo um grande número de drogas de natureza animal e vegetal. Houve tempos em que elas eram a mais importante fonte de medicamentos, contudo, no início da década de 40, essa antiga forma de terapêutica começou a perder sua importância, sendo cada vez mais substituída por medicamentos sintéticos, por ser considerada desprovida de fundamento científico (CARLINI, 2003; CAMPOS *et al.*, 2002).

Historicamente, foi a partir do isolamento da morfina no século XIX, que a pesquisa com produtos naturais tomou um impulso significativo (BALUNAS & KINGHON, 2005). Em determinado momento os avanços científicos propiciaram uma relativa perda de espaço para medicamentos sintéticos, entretanto o alto custo e os diversos efeitos colaterais apresentados contribuíram para o ressurgimento da fitoterapia (RABELO, 2008). As plantas e seus derivados representam cerca de 30% do mercado farmacêutico mundial (KIRKPATRICK, 2002).

Entre os anos de 1981 e 2002, aproximadamente 877 novas moléculas foram introduzidas no mercado e, cerca de 49% eram substâncias isoladas de produtos naturais, moléculas semi-sintéticas ou sintetizadas tomando como base um modelo de origem natural (NEWMAN *et al.*, 2003).

O Brasil possui cerca de 22% de todas as plantas e microorganismos existentes no mundo, o que o faz detentor de uma parcela significativa da biodiversidade, no entanto, estima-se que não mais que 25.000 espécies tenham sido alvo de algum estudo científico (CALIXTO, 2005).

Segundo Organização Mundial de saúde (OMS) 11% dos medicamentos considerados como básicos são produzidos a partir de plantas medicinais, e um número expressivo de medicamentos sintéticos e semi-sintéticos também são obtidos a partir de estruturas químicas oriundas de plantas (NIERO, 2003). No Brasil cerca de 20% da população é responsável por 63% do consumo de medicamentos alopáticos, o restante da população encontra nos produtos naturais a única fonte de recursos terapêuticos (FOGLIO *et al.*, 2006).

Ainda segundo a OMS, as plantas medicinais são as melhores fontes para a obtenção de uma grande variedade de drogas para a manutenção da saúde humana, onde cerca de 80% da população mundial busca em algum método tradicional o alívio para diversas sintomatologias ou quadros desagradáveis (RABELO, 2008).

Estima-se que 25 – 30% de todas as drogas atualmente disponíveis são derivadas de produtos naturais (plantas, microorganismos e animais). Apesar disso, nas últimas décadas, devido ao avanço da química industrial, a pesquisa em produtos naturais na indústria farmacêutica tem experimentado um leve declínio. Contudo para o tratamento de algumas doenças complexas os produtos naturais ainda representam uma inestimável fonte de produção de novos compostos, uma vez que eles representam estruturas selecionadas por mecanismos evolutivos em um período de tempo de milhões de anos. Além disso, poucas plantas têm sido cientificamente estudadas a fim de se avaliar sua qualidade, eficácia e segurança como agentes terapêuticos (CALIXTO, 2005).

O uso medicamentoso das plantas medicinais deve ser fundamentado em evidências experimentais comprobatórias, onde o risco a que se expõem aqueles que a utilizam é suplantado pelos benefícios que dela possam advir. O uso dos fitoterápicos na medicina humana não visa substituir os medicamentos registrados e já comercializados, mas sim aumentar a opção de escolha terapêutica dos profissionais de saúde, no sentido de utilizar medicamentos equivalentes, igualmente registrados com menores efeitos adversos,

possivelmente mais barato e/ou com espectro de ação mais adequados, com indicações terapêuticas complementares aos medicamentos existentes. (BRASIL, 2004).

O gênero *Hyptis*, constituído por mais de 300 espécies, exibe uma grande diversidade morfológica (HARLEY, 1988). Suas espécies aromáticas são freqüentemente usadas no tratamento de infecções gastrintestinais, câibras, dores e nas infecções da pele (SEPTIMIO, 1994). Dentre as espécies mais utilizadas pela população está a *Hyptis martiusii* Benth., conhecida popularmente como “Cidreira-brava” e utilizada pela população da Chapada do Araripe. Alguns efeitos farmacológicos do gênero *Hyptis* são citados, dentre os quais se destacam: ação antimicrobiana, antifúngica e inseticida (COUTINHO *et al.*, 2010; ZELLNER *et al.*, 2009; ZAPATA *et al.*, 2009; ILBOUDO *et al.*, 2010).

No estado de Sergipe, *Hyptis fruticosa* (Lamiaceae) é popularmente conhecida por “Alecrim de Tabuleiro” e a infusão de suas folhas é popularmente utilizada no combate à dor. O trabalho de Silva *et al.* (2006) confirmou o efeito analgésico de *Hyptis fruticosa*, sugerido pelo uso popular da infusão das folhas, nos testes da placa quente, da formalina e das contorções abdominais induzidas por ácido acético. Um estudo realizado com o óleo essencial obtido de folhas de *Hyptis ovalifolia*, por sua vez, apresentou uma eficiente atividade antifúngica contra dermatófitos como *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Tricophyton mentagrophytes* e *Tricophyton rubrum* (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Os dados citados na literatura têm comprovado a variedade de efeitos farmacológicos observados com produtos bioativos extraídos de gênero de *Hyptis*, muitos desses trabalhos apresentando resultados promissores. Este fato tem motivado a realização do presente trabalho, a fim de avaliar a ocorrência de um potencial efeito antimicrobiano do óleo essencial de *H. martiusii*, que venha a contribuir com o conhecimento e a identificação de efeitos farmacológicos.

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Analisar a composição química e avaliar as atividades antibacteriana, antifúngica e moduladora do óleo essencial da espécie vegetal *H. martiusii*.

2.2 Objetivos específicos:

- ✓ Obter o óleo essencial das folhas frescas de *H. martiusii*;
- ✓ Proceder à prospecção química do óleo essencial de *H. martiusii* a fim de se identificar os metabólitos secundários constituintes da espécie vegetal;
- ✓ Verificar a atividade antibacteriana e concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial frente a microrganismos por contato direto e gasoso;
- ✓ Avaliar a atividade moduladora da resistência bacteriana a aminoglicosídeos do óleo essencial de *H. martiusii* (OEHm);
- ✓ Verificar a atividade antifúngica e concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial frente a estes microrganismos por contato direto.

REVISÃO DE LITERATURA

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Família *Lamiaceae*

A família *Lamiaceae*, compreende cerca de 250 gêneros e 6.970 espécies (JUDD *et al.*, 1999), distribuídas em todo o mundo, sendo o maior centro de dispersão a região do Mediterrâneo (PORTE; GODOY, 2001).

É constituída por ervas, arbustos ou árvores; caules geralmente quadrados em corte transversal. As folhas são geralmente opostas espiraladas, simples, algumas vezes lobuladas ou dessecadas, ou pinadas ou palmadas, bordas lisas a serradas; estípulas ausentes (JUDD *et al.*, 1999).

Apresenta uma grande variedade de classes de micromoléculas, existindo representantes da via do acetato, da via do ácido chiquímico e provenientes de biossíntese mista (MENEZES, 1994).

Muitas espécies são utilizadas como condimentos importantes em culinária, sendo apreciadas pelo aroma ou pelo sabor que conferem aos alimentos (MENEZES, 1994).

3.2 Gênero *Hyptis*

O gênero *Hyptis* Jacq. enquadra-se no grande grupo das dicotiledôneas, na família *Lamiaceae* (labiatae), possui cerca de 350 espécies que são potencialmente exploráveis com uma ampla distribuição, principalmente nas regiões tropicais da América e África (BORDIGNON, 1990).

Ainda segundo Bordignon (1990), o centro da diversidade do gênero se encontra nos campos cerrados do Brasil Central, mais especificamente nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás. É composto por ervas, subarbustos, arbustos ou raramente árvores pequenas. Os caules geralmente são quadrangulares, as folhas opostas, simples ou mais raramente partidas, pecioladas ou sésseis ou curtamente pedunculadas, contendo substâncias aromáticas. São espécies exclusivamente neotropicais, apresentando uma distribuição do sul dos Estados Unidos e Caribe até a Argentina, excluindo apenas o extremo sul.

Com base nas classes químicas encontradas nas espécies de *Hyptis* estudadas, pode-se observar que estas seguem o mesmo padrão da família *Lamiaceae*, ou seja, predominância de metabólitos da via do acetato-mevalonato, mas com algumas substâncias de origem biossintética mista e da via do ácido chiquímico (FALCÃO, 2003). A Figura 1 abaixo mostra a síntese de metabólitos secundários do ácido Chiquímico.

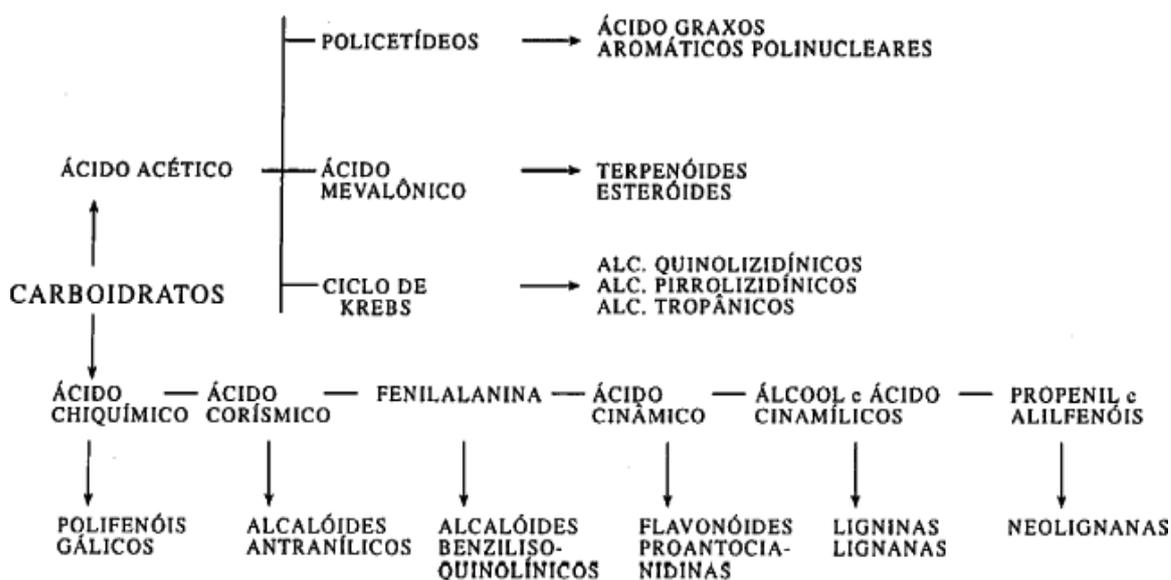


Figura 1: Síntese de metabólitos secundário do ácido chiquímico

Fonte: SAMPAIO-SANTOS; KAPLAN, 1997.

Na Figura 2 vê-se a espécie *H. martiusii* bastante comum na Chapada do Araripe, estado do Ceará, nordeste do Brasil (COUTINHO, 2009).



Figura 2: Folhas da espécie *H. martiusii* Benth.

3.3 O efeito farmacológico de substâncias extraídas de plantas sobre microorganismos diversos

Os microorganismos respondem por boa parte dos quadros patológicos apresentados ao homem e, as bactérias constituem uma fonte considerável já que são passíveis de modificações genéticas, o que as tornam mais resistentes em alguns casos (PACKER & LUZ, 2007).

A utilização de produtos naturais como agentes antimicrobianos é uma prática bastante disseminada e que muitas vezes pode surtir efeitos satisfatórios, daí a sua larga utilização. No entanto, é válido salientar que estes produtos naturais também podem ser fontes de diversas

substâncias tóxicas (COSTA *et al.*, 2005). Dessa forma a pesquisa por substâncias naturais que possuam efeitos antimicrobianos benéficos ao homem é uma prática bastante crescente e que vem rendendo importantes resultados.

Os grupos bacterianos, principalmente *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* são alguns dos representantes mais associados às infecções do trato gastrointestinal, urinário e doenças de pele. Segundo Fagundes-Neto *et al.* (2000) a doença diarréica é uma das principais causas de morte entre crianças de idade inferior a 5 anos, nas populações de baixa renda dos países em desenvolvimento, apresentando como principal causador a bactéria *E. coli*. Esta ainda é conhecida pelos altos índices de infecções nosocomiais, sendo classificado entre os quatro mais incidentes, assim como *Pseudomonas aeruginosa*, um microorganismo oportunista (KONEMAN, 2008)

E. coli é frequentemente isolada em infecções do trato urinário e a severidade da infecção depende da virulência da linhagem contaminante e da suscetibilidade do hospedeiro. (FOWLER JR & STAMEY., 1977).

S. aureus representa o agente etiológico mais comum em infecções como furúnculo, carbúnculo, abscesso, miocardite, endocardite, pneumonia, meningite e artrite bacteriana (VERHOEFF *et al.*, 1999). Tuon *et al.* (2006) realizou um estudo de caso em uma paciente de 21 anos, onde foi detectado abscesso cerebral resultante de uma osteomielite induzido por *S. aureus*. Esta é apenas uma das complicações mais frequentes resultantes de osteomielite frontal por *S. aureus*, outras poderiam ser empiema epidural, subdural e meningite.

Esta bactéria também é descrita como um dos principais agentes nosocomiais, onde diversos fatores podem estar associados a sua resistência em ambientes hospitalares, assim como presença de cateter urinário, uso prévio de antimicrobianos, uso de cateter venoso central, mucosite entre outros, o que vem a explicar o alto índice de morbidade e mortalidade por *S. aureus* em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (THULER *et al.*, 1999).

Pseudomonas aeruginosa é outro importante patógeno que apresenta um importante caráter oportunista, além de ser uma das principais responsáveis por infecções no ambiente hospitalar no mundo, principalmente em unidades de terapia intensiva, estudos realizados nos Estados Unidos constataram uma mortalidade bruta superior a 25% (WISPLINGHOFF *et al.*, 2004; DRISCOLL *et al.*, 2007) Este microorganismo não é um freqüente responsável por infecções comunitárias, mas ainda assim representa cerca de 6,8% de bacteremia por bacilos Gram-negativos (SCHECHNER *et al.*, 2009).

As pesquisas com agentes antifúngicos também ocorre com frequência, nesse contexto destaca-se a busca por substâncias de origem natural que apresentem tal atividade (LU *et al.*, 2007; MBWAMBO *et al.*, 2007).

Alguns desses microorganismos apresentam-se como verdadeiros agentes infecciosos. A Candidíase é uma das principais infecções fúngicas oportunistas que têm aumentado de forma persistente ao longo dos últimos 30 anos (GHANNOUM, 2001; MELO *et al.*, 2004).

O excessivo uso de antimicrobianos de amplo espectro, terapia antineoplásicas, o aumento de pacientes acometidos de SIDA (Síndrome da Imunodeficiência adquirida) são alguns dos principais fatores que elevaram, substancialmente, a quantidade de casos por candidíase (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2005). A candidíase orofaríngea é uma das manifestações mais comuns em pacientes com SIDA. O tratamento apresenta alguns problemas pelo fato da anfotericina B, um dos medicamentos mais utilizados para esse fim, apresentar alta toxicidade. (GUGNANI *et al.*, 2003; MELO *et al.*, 2004).

Uma espécie de *Candida* que pode apresentar resistência a antifúngicos é *Candida Krusei*, um fungo bastante isolado em pacientes com distúrbios hematológicos malignos, como leucemias, e em pacientes transplantados. Este microorganismo foi o isolado mais comum em serviços de hemato-oncologia segundo Pfaller (2007).

C. krusei apresenta um grande interesse científico principalmente pela característica de apresentar resistência a antifúngicos como o fluconazol (GARCÍA-RODAS *et al.*, 2011).

A predominância de candidemia em pacientes neutropênicos é incrementada também pela *C. tropicalis*, onde no Brasil destaca-se como o segundo agente mais frequente (NUCCIA & COLOMBO, 2007). Algumas pesquisas referem o uso de substâncias naturais como agentes antifúngicos. A família das *Lamiaceae*, de acordo com alguns autores apresenta este potencial o que pode ser percebido também em algumas espécies do gênero *Hyptis* (ZAPATA *et al.*, 2009, MBATCHOU, ABDULLATIF E. GLOVER, 2010).

A atividade biológica dessas espécies vegetais parece está intimamente ligada à grande presença de monoterpenos e sesquiterpenos (ALMEIDA & ALBUQUERQUE, 2002).

3.4 Atividades farmacológicas da família *Lamiaceae*

3.4.1 Atividade antimicrobiana e antifúngica

Lamiaceae é uma família botânica que apresenta inúmeros representantes, com os mais diversos constituintes químicos, como terpenos e flavonóides (COLE, 1992).

O *Origanum vulgare* (orégano) é uma *Lamiaceae* extremamente versátil e tem sido utilizada há muito tempo na medicina popular. No entanto, apenas agora, tem despertado interesse por suas propriedades antiespasmódica, antiséptica e propriedades tônicas. Esta espécie apresenta um amplo espectro de atividade antimicrobiana que tem sido alvo de pesquisas *in vivo* e *in vitro*. Pouco se sabe ainda sobre sua atividade contra bactérias multirresistentes isoladas de pacientes com infecções hospitalares (SAHIN *et al.*, 2004). Segundo Costa *et al.*,(2009) o carvacrol e o timol são os principais componentes isolados desta espécie, e em estudos *in vitro*, o óleo essencial de *O. vulgare* foi capaz de inibir o

crescimento de linhagens de *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *Klebsiela pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* Meticilina resistente (MRSA).

Ferreira (2010), investigou o potencial antimicrobiano *in vitro* da *Aegiphila sellowiana* Cham., uma *Lamiaceae*, popularmente conhecida como “Tamanqueira”, contra patógenos bucais. Esta é uma espécie arbórea que ocorre com frequência na América Latina, principalmente no Brasil, e bastante utilizada na medicina popular como um agente antiinflamatório e também contra veneno de cobra. No entanto, não existem estudos fitoquímicos ou farmacológicos anteriores que comprovem a sua eficácia. O extrato etanólico das folhas desta espécie demonstrou atividade antibacteriana contra *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mitis* (ATCC 49456) e *Streptococcus sanguinis*. O estudo da fração n-hexânica foi a mais efetiva e, os dados obtidos por CG-EM revelaram que ésteres de ácidos graxos, esteróides e hidrocarbonetos sesquiterpênicos alifáticos são os constituintes majoritários desta fração e podem ser responsáveis pela atividade (FERREIRA *et al.*, 2010).

A espécie *Plectranthus amboinicus* Lour. (*Lamiaceae*) é uma planta nativa da Ásia e seu óleo essencial apresenta atividade antibacteriana, o carvacrol é um dos seus constituintes majoritários, o óleo essencial desta espécie também apresenta atividade germicida, antisséptica e antifúngica (MATOS, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Algumas espécies de *Lamiaceae* também são responsáveis por atividade antifúngica, como, por exemplo, o “Alecrim de vargem”. As preparações de hidrolato e óleo essencial foram avaliadas quanto à atividade antifúngica sobre a germinação de esporos e crescimento micelial da espécie *Colletotrichum gloeosporioides* (responsável pela antracnose), principal entrave para o desenvolvimento da cultura do maracujazeiro, muito importante pela agregação de renda para agricultores familiares no Norte de Minas. Os resultados mostraram que o hidrolato não apresentou resultados significativos, diferentemente da pesquisa com o

óleo essencial do alecrim de vargem, onde o mesmo inibiu 100% da germinação de esporos e crescimento micelial (SILVA, A.C., 2009).

3.4.2 Atividade hipocolesterolêmica e antiedematogênica

Vitex megapotamica (Spreng) Moldenke (*V. montevidensis* Cham.) – “Tarumã” é uma *Lamiaceae* que aponta para diversas propriedades terapêuticas, como as ações antiinflamatória, diurética, hipocolesterolêmica, em casos de reumatismos e afecções cutâneas, distúrbios pulmonares, diminuição de peso corporal, dentre outros (REYES, 2003; ALICE, 1995).

Brandt (2009) avaliou a atividade hipocolesterolêmica e hipolipidêmica da *Vitex megapotâmica*, onde induziu a hipercolesterolemia em ratos com o modelo que preconiza a utilização de propiltiluracil 1,25 mg/300 g de peso e colesterol 200 mg/kg de peso e depois os tratou com o extrato hidroalcoólico na concentração de 300 mg/kg por via oral. Também se observou através de avaliação toxicológica que os animais não apresentaram alterações significativas nas dosagens bioquímicas para avaliação das funções renal, hepática e cardíaca, de maneira que o estudo aponta para um efeito hipocolesterolêmico e hipolipêmico do extrato hidroalcoólico de *Vitex megapotâmica*.

A análise fitoquímica da tarumã revelou a presença de compostos como taninos, glicosídeos flavonônicos, polifenóis, alcalóides e saponinas. Credita-se, boa parte desta atividade ao efeito inibidor das ciclooxigenases e lipooxigenases por parte dos flavonóides, o que faz diminuir a oxidação do LDL (*low density lipoprotein*) e aumenta a excreção lipídica (FALUDI *et al.*, 2005).

A espécie *Peltodon radicans* conhecida popularmente como “Paracari”, encontrada principalmente na região da Amazônia (LORENZI; MATOS, 2002) tem sido utilizada em

tratamentos de asma, bronquite, coqueluche, inflamação dos rins e fígado, afecções da pele e como vermífugo, além de ser usado no tratamento contra veneno de cobra (BARBERÁN *et al.*, 1988; PAIVA & MACHADO, 2005). No estudo os autores relatam que foi observada atividade antiedematogênica, principalmente do extrato preparado a partir das flores. A pesquisa indicou que o extrato foi eficiente na neutralização da atividade edematogênica do veneno do *Bothrops atrox*.

Alguns triterpenos pentacíclicos parecem está relacionados com a atividade em questão, como o ácido ursólico e o ácido tormêntico (LORENZI; MATOS, 2002).

3.4.3 Atividade antiparasitária

A família *Lamiaceae* é utilizada largamente em diferentes quadros patológicos no âmbito da medicina popular. No Mediterrâneo o gênero *Thymus* é utilizado com bastante frequência por sua suposta atividade antiinflamatória, antioxidante e também antiparasitária (JAAFARI *et al.*, 2007; TEPE *et al.*, 2005; AMARAL *et al.*, 2006)

Algumas espécies têm sido utilizadas como agentes antiparasitários, por exemplo, a *Mentha villosa*, uma das espécies de hortelã mais utilizadas devido a suas propriedades farmacológicas. Nascimento (2009) avaliou a atividade antiparasitária *in vitro* e *in vivo*. Os testes para avaliação *in vivo* não se mostraram eficazes, diferentemente da avaliação *in vitro*, onde houve um controle efetivo das larvas de nematóides.

3.4.4 Atividade antiespasmódica e antitumoral

Estudos relatam os vários efeitos observados por espécies do gênero *Thymus*, como por exemplo, efeito antiespasmódico (RICHARD *et al.*, 1985; MEISTER *et al.*, 1999).

Jaafari *et al.*, (2007) avaliou a atividade antitumoral de algumas espécies de tomilho colhidos em diferentes regiões Marroquinas. A atividade foi estudada contra o mastocitoma da linhagem P815, de modo geral os principais constituintes químicos foram o carvacrol, o timol, borneol e o p-cimeno. No estudo observou-se a atividade dos óleos de diferentes espécies, e o carvacrol foi o composto que apresentou um maior efeito citotóxico. Da mesma forma com os óleos extraídos de espécies diferentes, se percebeu que àqueles que apresentavam uma maior concentração de carvacrol fatalmente era os que demonstravam melhor desempenho frente o mastocitoma.

3.5 Panorama dos constituintes químicos e atividade farmacológica de espécies do gênero *Hyptis*

Diversos estudos descrevem a composição química e as propriedades biológicas de várias espécies do gênero *Hyptis*.

A presente pesquisa permitiu uma atualização do gênero *Hyptis* abordando os principais metabólitos secundários identificados ou isolados e as atividades biológicas relatadas de 2001 até os dias atuais. A revisão foi realizada nos periódicos disponíveis no banco de dados da CAPES e *Chemical abstract*.

Na busca, utilizou-se a palavra chave “*Hyptis*”, refinando com a frase “chemical composition and biological activities” onde foram encontradas 2140 referências. Dentre essas, foram selecionados os artigos publicados após 2001, que contivesse a espécie estudada, as partes utilizadas da planta, os produtos naturais obtidos, os componentes majoritários isolados ou identificados nos óleos essenciais, dessa forma, resultaram 71. Essa coleta de dados permitiu a elaboração dos Quadros 1, 2 e 3.

QUADRO 1: Espécies de *Hyptis*, constituição química e respectivas atividades descritas nos últimos dez anos.

Espécies	Parte da planta	Fontes	Atividades	Principais compostos isolados ou identificados (%)	Referências
<i>Hyptis pectinata</i> Poit.	Folhas	Óleo essencial	Antiinflamatória/antinoceptiva	β -cariofileno; óxido de cariofileno	Raymundo <i>et al.</i> , 2011
<i>H. fruticosa</i> Salzm. ex Benth.	Folhas	Extrato etanólico	anti-inflamatória e antioxidante	-	Andrade <i>et al.</i> , 2010
<i>H. fruticosa</i> Salzm. ex Benth.	Partes aéreas	Extrato diclorometano	Vasorelaxante	-	Moreira <i>et al.</i> , 2010
<i>H. suaveolens</i> Poit.	Folhas	Óleo essencial	Antioxidante	-	Moreira <i>et al.</i> , 2010
<i>H. suaveolens</i> Poit.	Folhas	Óleo essencial	Antifúngica	Eucaliptol, gama-elemeno, beta-pineno, (+)-3-careno, trans-beta-cariofileno, germacreno	Moreira <i>et al.</i> , 2010

<i>H. sidifolia</i> (L'Her.) Briq.	Folhas	Extrato Aquoso	Antibacteriano	-	Bussmann <i>et al.</i> , 2010
<i>H. suaveolens</i> Poit.	Partes aéreas	Óleo essencial	Inseticida	-	Ilboudo <i>et al.</i> , 2010
<i>H. spicigera</i>	Partes aéreas	Óleo essencial	Inseticida	-	Ilboudo <i>et al.</i> , 2010
<i>H. spicigera</i> Lam.	Folhas	Folhas pulverizadas	Inseticida	-	Ahmed, Yusuf e Sule, 2010
<i>H. suaveolens</i> Poit.	Folhas	Extrato de Éter de Petróleo	Larvicida	-	Okigbo, Okeke e Madu, 2010
<i>H. suaveolens</i> Poit.	Planta	Extrato etanólico	Antifúngica	-	Mbatchou, Abdullatif e. Glover, 2010
<i>H. suaveolens</i> Poit.	Folhas	Extrato Etanólico	Antioxidante Reversão do efeito da dexametasona	-	Ravindrasingh <i>et al.</i> , 2010
<i>H. passerina</i>	Folhas e flores	Óleo essencial	Antimicrobiano	β -epi-acorenol, espatulenol, β - cariofileno; óxido de cariofileno	Zellner <i>et al.</i> , 2009

<i>H. mutabilis</i>		Óleo essencial	Antibacteriana (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	Fenchone, 1,8-Cineol, trans- β -Cariofileno, Biciclogermacreno, Germacreno D	Bueno-Sánchez <i>et al.</i> , 2009
<i>H. crenata</i> Pohl ex Benth	Folhas e ramos finos frescos e secos	Extrato etanólico	Antioxidante	-	Rebelo <i>et al.</i> , 2009
<i>H. crenata</i> Pohl ex Benth	Folhas	Extrato metanólico	Antioxidante	-	Rebelo <i>et al.</i> , 2009
<i>H. suaveolens</i> Poit.	Planta	Extrato Aquoso e Etanólico	Antiulcerogênico	-	Das <i>et al.</i> , 2009
<i>H. suaveolens</i> Poit.	Folhas	Óleo essencial	Repelente Inseticida	Sabineno; terpin-4-ol; β -pineno; β -cariofileno	Tripathi and Upadhyay, 2009
<i>H. fruticosa</i> Salzm. ex Benth.	Partes aéreas	Extrato	Vasorrelaxante		Moreira <i>et al.</i> , 2009
<i>H. spicigera</i> Lam.	Partes aéreas	Óleo essencial	Inseticida	-	Othira <i>et al.</i> , 2009

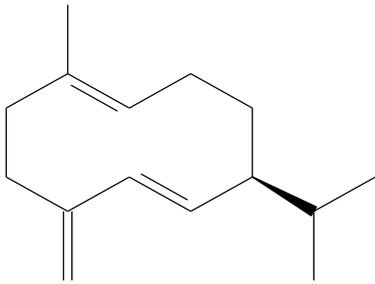
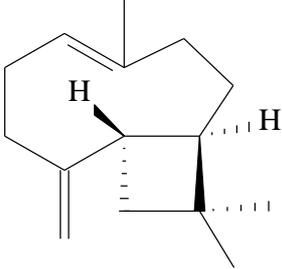
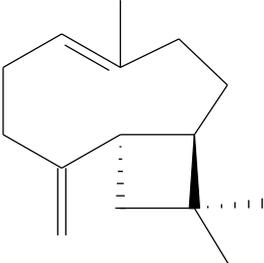
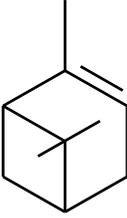
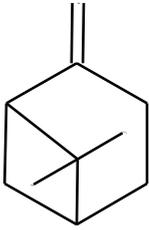
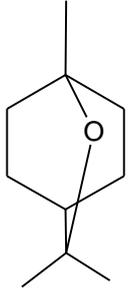
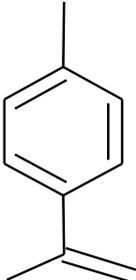
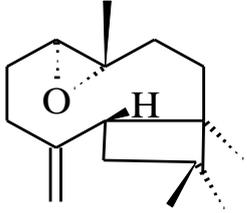
<i>H. mutabilis</i>	Folhas	Óleo essencial	Antifúngico	epóxido de cis-piperitona e 1,8-cineol	Zapata <i>et al.</i> , 2009
<i>H. spicigera</i> Lam.	Folhas	Extrato aquoso	Anticonvulsivante	-	Ngo Bum <i>et al.</i> , 2009
<i>H. pectinata</i> Poit.	Folhas	Óleo essencial	Antimicrobiana	-	Nascimento <i>et al.</i> , 2008
<i>H. pectinata</i> Poit.	Folhas	Óleo essencial	Antimicrobiana	β -cariofileno; óxido de cariofileno; calamusenone	Santos <i>et al.</i> , 2008
<i>H. fruticosa</i> Salzm. ex Benth.	Folhas	Óleo essencial	Larvicida	1,8-cineol, espatulenol, β -cariofileno; biciclogermacreno e cânfora	Silva <i>et al.</i> , 2008
<i>H. pectinata</i> Poit.	Folhas	Óleo essencial	Larvicida	β -cariofileno; óxido de cariofileno	Silva <i>et al.</i> , 2008
<i>H. suaveolens</i> Poit.	Sementes	Extrato Metanólico	Inseticida	-	Musa, 2008
<i>H. lacustris</i> A. St.-Hil. ex Benth.	Folhas	Extrato etanólico	Leishmanicida	-	Estevez <i>et al.</i> , 2007
<i>H. fruticosa</i> Salzm. ex Benth.	Folhas	Óleo essencial	Hipotensor	-	Santos <i>et al.</i> , 2007

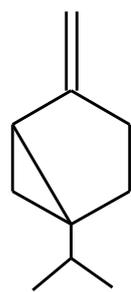
<i>H. spicigera</i> Lam.	-	Óleo essencial	Inseticida	β -cariofileno; α -pineno; sabineno; 1,8-cineol	Noudjou <i>et al.</i> , 2007
<i>H. suaveolens</i> Poit.	Partes aéreas	Óleo essencial	Antibacteriana, antifúngica e antioxidante	Sabineno, α -terpinoleno, 1,8 – cineol, β -cariofileno	Natatinon, Chowwanapoonpohn e Okonogi, 2007
<i>H. fruticosa</i> Salzm. ex Benth.	Folhas	Óleo essencial	Antinoceptivo	Biciclogermacreno, 1,8-cineol, α -pineno e β -cariofileno	Menezes <i>et al.</i> , 2007
<i>H. suaveolens</i> Poit.	Partes aéreas	Óleo essencial	Antioxidante/Antibacteriana	Sabineno, α -terpinoleno, 1, 8 – cineol	Tachakittirungrod e Chowwanapoonpohn, 2007
<i>H. fruticosa</i> Salzm. ex Benth.	Folhas	Extrato aquoso	Antinoceptivo	-	Silva <i>et al.</i> , 2006
<i>H. pectinata</i> Poit.	Folhas	extrato aquoso	Antidepressivo	-	Bueno <i>et al.</i> , 2006
<i>H. spicigera</i> Lam.	Folhas	Folhas pulverizadas	Nematicida	-	Jesse, Sule e Philip, 2006
<i>H. suaveolens</i> Poit.	Folhas	Isolada	Anti-inflamatória	Suaveolol; metil-suaveolato	Grassia <i>et al.</i> , 2006

<i>H. suaveolens</i> Poit.	Partes aéreas	Substância isolada	Anti- <i>Helicobacter pylori</i>	cirsilineol e cirsimaritin	Isobe <i>et al.</i> , 2006
<i>H. pectinata</i> Poit.	Folhas	Extrato aquoso	Hepatoprotetor	-	Melo <i>et al.</i> , 2006
<i>H. fasciculata</i>	Partes aéreas	Extrato etanólico	Antioxidante	-	Silva <i>et al.</i> , 2005
<i>H. verticillata</i> Jacq.	Partes aéreas	Óleo essencial	Inseticida	cadina-4,10(15)-dien-3-one / aromadendr-1(10)- en-9-one	Facey <i>et al.</i> , 2005
<i>H. suaveolens</i> Poit.	Folhas	Extrato de éter de petróleo (isolado)	Antiplasmodial	13-dioxiabiet-epi-8 (14)-en-18- ol	Chukwujekwu <i>et al.</i> , 2005
<i>H. pectinata</i> Poit.	Folhas	Extrato aquoso	Antiedematogênica	-	Arrigoni-Blank <i>et al.</i> , 2005
<i>H. suaveolens</i> Poit.	Folhas	Óleo essencial	Antifúngico	1,8-Cineol, β -Pineno, β - Cariofileno	Donahaye <i>et al.</i> , 2004
<i>H. ovalifolia</i>	Folhas	Óleo essencial	Antifúngica	γ -cadineno; viridifloral; óxido de cariofileno	Oliveira <i>et al.</i> , 2004

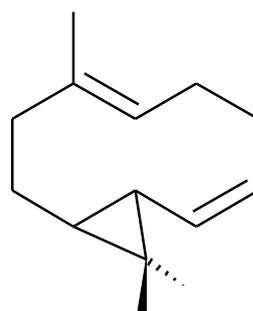
<i>H.ovalifolia</i>	Folhas	Óleo	Antifúngica	-	Souza, 2003
<i>H.ovalifolia</i>	Folhas	Extrato Etanólico	Antifúngica	-	Souza <i>et al.</i> , 2002
<i>H. suaveolens</i> Poit.	Folhas	Extrato Etanólico	Antifúngica	-	Souza <i>et al.</i> , 2002

QUADRO 2: Principais constituintes identificados em espécies de *Hyptis*.

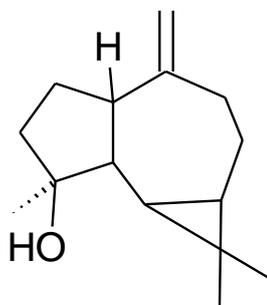
 <p>Germacrene D</p>	 <p>Trans-cariofileno</p>
 <p>β-cariofileno</p>	 <p>α-pineno</p>
 <p>Beta-pineno</p>	 <p>1,8-cineol</p>
 <p>α-terpinoleno</p>	 <p>óxido de cariofileno</p>



Sabineno



biciclogermacreno



espatulenol

3.6 Panorama dos constituintes químicos e atividade farmacológica de *H. martiusii*

Benth.

No levantamento bibliográfico realizado, observou-se que poucos artigos faziam referência a espécie *H. martiusii*, o quadro 3 mostra as principais publicações nos últimos 10 anos. Observa-se que dentre as publicações apenas um trabalho faz referência ao uso de óleo essencial de *H. martiusii*, todas as outras pesquisas relatam o uso de extrato, na sua maioria etanólico. De acordo com Araújo (2003), os principais constituintes identificados no OEHm são terpenos, o que se pode observar a existência de atividade inseticida, já sugerida em outra espécies de *Hyptis spicigera* e *Hyptis verticilata* (ILBOUDO *et al.*, 2010; AHMED, YUSUF E SULE, 2010; OTHIRA *et al.*, 2009; NOUDJOU *et al.*, 2007; FACEY *et al.*, 2005).

De acordo com o levantamento bibliográfico realizado a principal atividade biológica evidenciada é a antimicrobiana, a avaliação de citotoxicidade foi verificada utilizando-se o óleo essencial de *H. martiusii*, estando associado o seu efeito, possivelmente a existência de diterpenos (COUTINHO *et al.*, 2010; COUTINHO *et al.*, 2009; COUTINHO *et al.*, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2006).

Costa *et al.*, (2005) estudaram o óleo essencial quanto ao efeito larvicida. Além disso observaram que os constituintes majoritários foram o δ -3-careno e 1,8-cineol.

QUADRO 3: Espécie *H. martiusii*, constituição química e respectivas atividades descritas nos últimos dez anos.

Parte da planta	Fontes	Atividades	Principais compostos isolados ou identificados (%)	Referências
Partes aéreas	Extrato etanólico	Antimicrobiano (MRSA)	-	Coutinho <i>et al.</i> , 2010
Folhas	Extrato etanólico	Antioxidante	-	Santos <i>et al.</i> , 2010
Partes aéreas	Extrato Etanólico	Antibacteriano (efeito aditivo)	-	Coutinho <i>et al.</i> , 2010
Folhas	Extrato etanólico	Antibacteriana-sinergismo (<i>E. coli multirresistente</i>)	-	Coutinho <i>et al.</i> , 2009
Partes aéreas	Extrato Etanólico	Fototoxicidade	-	Coutinho <i>et al.</i> , 2009
Raízes	Substancia isolada (Tanshinones)	Genotoxicidade	-	Cavalcanti <i>et al.</i> , 2008
Raízes	Extrato Aquoso	Citotoxicidade	7 β -hidroxi-11, 14-dioxoabieta-8, 12-diene / 7 α -acetoxi-12-hidroxy-11, 14-diaxoabieta-8, 12-dieno	Araújo <i>et al.</i> , 2006
Folhas secas	Óleo essencial	larvicida	δ -3-careno; 1,8-cineol	Costa <i>et al.</i> , 2005

Raízes	Extrato hexânico	Citotoxicidade	Carnasol e 11,14-dihidroxi-8 11,13-abietatrien- 7-ona	Costa-Lotufo <i>et al.</i> , 2004
Folhas	Óleo essencial	Inseticida	Delta-3-careno 1-8-cineol α -pineno β -cariofileno	Araújo <i>et al.</i> , 2003

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microorganismos (Bactérias e Fungos)

Para a realização da pesquisa foram utilizadas quatro linhagens bacterianas padrão (*E. coli* ATCC25922, *S. aureus* ATCC12692, *Bacillus cereus* ATCC33018 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442) cedidas pelo Instituto Oswaldo Cruz e duas multirresistentes de isolados clínicos (*Escherichia coli* Ec 27 e *Staphylococcus aureus* Sa 358) apresentando o perfil de resistência conforme o Quadro 4 abaixo. Todas as linhagens foram mantidas em *Agar infusão de coração* (HIA, Difco Laboratórios Ltda.). Antes dos ensaios, as linhagens foram cultivadas por 18h a 37°C em caldo infusão de cérebro e coração (BHI, Difco Laboratórios Ltda.).

Para realização dos testes antifúngicos, as linhagens foram *Candida albicans* ATCC40006, *Candida Krusei* ATCC6438 e *Candida tropicalis* ATCC40042, também cedidas pelo Instituto Oswaldo Cruz.

QUADRO 4: Perfil de resistência das linhagens multirresistentes utilizadas nos ensaios antibacterianos.

Bactéria	Isolamento	Perfil de resistência*
<i>E. coli</i> (Ec27)	Escarro	AZT, AMX, AMP, AMI, AMOX, CFR, CEC, CF, CAZ, CIP, CL, IMI, CAN, SZT, TET, TO
<i>S. aureus</i> (Sa 358)	Ferida cirúrgica	OXA, GEN, TO, AMI, CAN, SIS, NEO, PARA, BUT, NET

*Aztreonam (AZT); Amoxicilina (AMX); Ampicilina (AMP); Amicacina (AMI); Amoxicilina (AMOX); Cefadroxil (CFR); Cefaclor (CEC); Cefalotina (CF); Ceftazidima (CAZ); Ciprofloxacina (CIP); Cloranfenicol (CL); Imipenem (IMI); Canamicina (CAN); Sulfametrim (SZT); Tetraciclina (TET); Tobramicina (TO); Oxacilina (OXA); Gentamicina (GEN); Sisomicina (SIS); Neomicina (NEO); Paramomicina (PARA); Butirosina (BUT); Netilmicina (NET).

4.2 Coleta do material vegetal

As folhas de *H. martiusii* foram coletadas no mês de fevereiro de 2009, na Chapada do Araripe (Figura 3) no município do Crato, Ceará, Brasil O material vegetal foi identificado e uma exsicata foi depositada em Herbário Carirense Dárdano de Andrade nas respectivas coleções com o número 4610.



Figura 3: Local da realização da coleta de folhas de *H. martiusii* na Chapada do Araripe.

4.3 Extração do óleo essencial das folhas frescas de *H. martiusii* Benth

A metodologia de extração foi realizada assim como demonstrado na Figura. Amostras de folhas de *H. martiusii* (Figura 4) foram coletadas, trituradas e posteriormente submetidas ao processo de Hidrodestilação, em aparelho tipo Clevenger (Figura 5) modificado por Gottlieb (1960). Foram colocados 274 g das folhas de *H. martiusii* em um balão de 5 litros juntamente com 2,5 L de água, e mantido em ebulição por 3 horas. Ao óleo essencial de *H. martiusii* (OE_{Hm}) obtido foi adicionado sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), e o mesmo foi

estocado em refrigeração a $< 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior realização de testes (Figura 6). O óleo obtido foi analisado com uso de um cromatógrafo gasoso-acoplado a espectrômetro de massas.



Figura 4: Folhas de *H. martiusii* coletadas na Chapada do Araripe.



Figura 5: Aparelho tipo Clevenger modificado por Gottlieb.

4.4 Análise química do óleo essencial (Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massas)

A análise da composição química do OEHm foi realizada usando um sistema de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG/EM), em aparelho SHIMADZU com detector seletivo de massa QP5050A, operando sob energia de ionização de 70 eV. A coluna de capilaridade utilizada foi DB-5HT (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno); nas seguintes especificações: temperaturas de 270 °C no injetor e 290 °C no detector, tendo hélio como gás de arraste (1,7 mL/min); velocidade linear de 47,3 cm/seg; fluxo total de 24 mL/min; fluxo de portador de 24 mL/min; pressão de 107,8 kPa; e a temperatura de aquecimento da coluna foi programada para 60 °C (2 min) - 180 °C (1 min) a 4 °C/min e de 180 - 260 °C a 10 °C/min (10 min). A identificação dos componentes foi realizada por comparação entre seu respectivo espectro de massa com aqueles padrões registrados na base de dados da biblioteca Wiley 229 e entre os índices de retenção calculados com valores da literatura especializada (Adams, 1991).

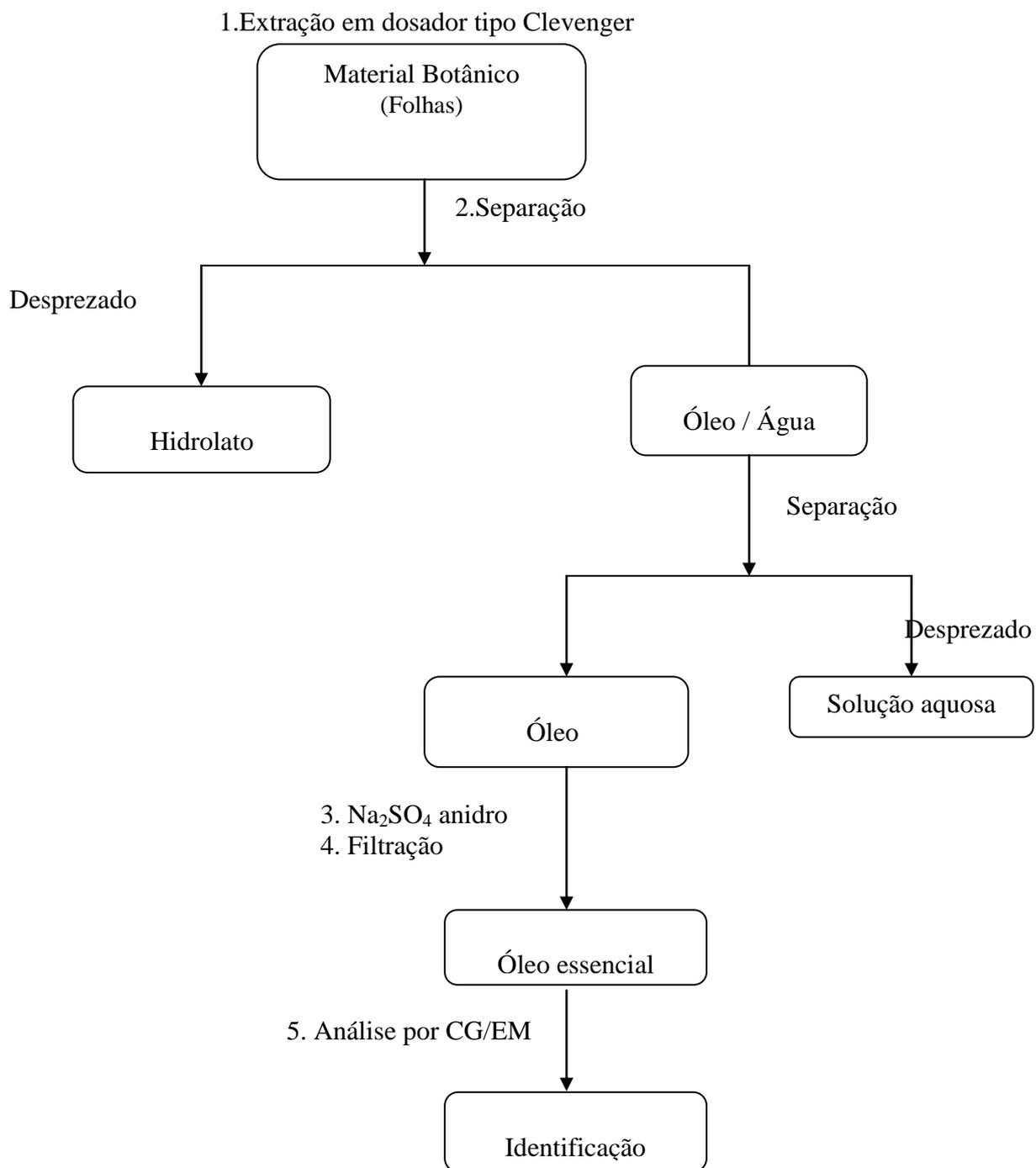


Figura 6: Fluxograma de extração do óleo essencial de *H. martiusii* Benth.

4.5 Avaliação da atividade antibacteriana e concentração inibitória mínima (CIM)

As bactérias foram inoculadas em caldo *Brain Heart Infusion Broth* (BHI) e em seguida foi realizado seu crescimento em estufa bacteriológica a 37°C, por 24 horas. Após este período a suspensão bacteriana foi submetida à diluição serial (1024, 512, 256, 128, 64, 32,16, 8, 4, 2 e 1 µg/ml) e plaqueamento em meio BHI sob diferentes concentrações do óleo (CLEELAND & SQUIRES, 2003).

A atividade antibacteriana do OEHm foi avaliada utilizando a metodologia de microdiluição em caldo, com base no documento M7-A6 (CLSI/NCCLS, 2002) para bactérias. Previamente aos testes, as cepas bacterianas foram ativadas em meio BHI a 3,8% durante 24 h a 35 ± 2 °C. Após este cultivo, o inoculo foi padronizado, que consistiu na preparação de uma suspensão bacteriana em BHI, cuja turvação foi similar ao tubo 0,5 da Escala Macfarlane (1×10^8 UFC/mL). A seguir, esta suspensão foi diluída a 1×10^6 UFC/ mL em caldo BHI a 10%, e volumes de 100 µL e então homogeneizados nos poços de uma placa de microdiluição acrescido de diferentes concentrações do óleo de acordo com a Figura 7A e 7B, resultando num inoculo final de 5×10^5 UFC/mL (HADACEK; GREGER, 2000; NCCLS, 2002).

Para as cepas bacterianas, a leitura foi realizada utilizando o seguinte procedimento: no final do período de incubação, adicionou-se 20µL de solução do corante resazurina a 0,01 % (Figura 7C), o qual é reconhecido como um indicador colorimétrico de óxido-redução. Assim, quando da observação de mudança de coloração do corante (azul para vermelho) considera-se como indicador de crescimento microbiano. É considerado como CIM a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir o crescimento da cepa ensaiada, verificado por uma não mudança da coloração do corante indicador.

A partir da determinação da CIM, o inoculo das ultimas concentrações foi repicado em placas com BHI e mantido em estufa a 37°/24h para verificar e confirmar o ensaio anterior.

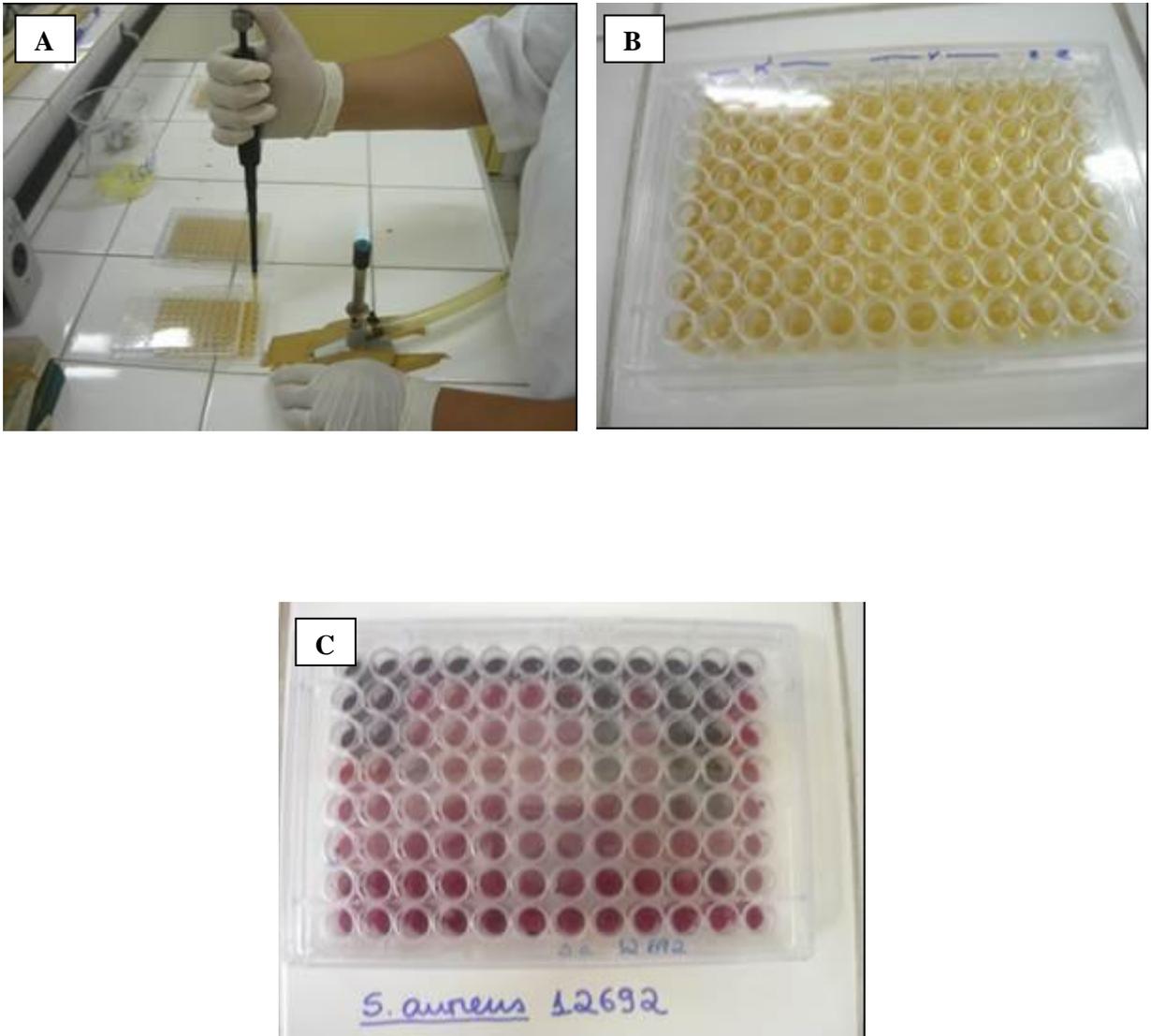


Figura 7: (A) Inoculação da suspensão bacteriana nos poços de microdiluição. (B) Placa de microdiluição. (C) Revelação com resazurina sódica.

4.6 Avaliação da atividade moduladora por microdiluição

Para avaliação da atividade moduladora por microdiluição, os antibióticos aminoglicosídeos foram acrescidos juntamente com as bactérias em placas de diluição seriada (COUTINHO, 2009). A sua CIM e a dos antibióticos aminoglicosídeos utilizados (neomicina, canamicina, amicacina e gentamicina) foram determinadas de acordo com o método da microdiluição de acordo com o documento CLSI M7-A6, utilizando concentrações subinibitórias em BHI a 10%. As amostras a serem testadas foram preparadas em concentração dobrada (1024 µg/ mL) em relação à concentração inicial (JAVADPOUR *et al.*,1996). Para avaliação do OEHm como modulador da resistência dos antibióticos, as bactérias a serem testadas foram adicionados nos poços das placas de microdiluição juntamente com os aminoglicosídeos (Sigma Chemical Co.) e também, o OEHm, em concentrações subinibitórias (CIM/8). O teste foi acompanhado de um controle negativo que consistiu na solução de microrganismos e dos antibióticos. As placas foram incubadas por 24 h a 37° C. A leitura foi realizada pela adição da resazurina sódica.

A metodologia empregada para pesquisa antifúngica foi à mesma utilizada para bactérias. Nessa avaliação foram utilizadas três culturas padrão cedidas pela Universidade Federal da Paraíba, *Candida albicans* ATCC 40006, *Candida krusei* ATCC 6438, *Candida tropicalis* ATCC 40042, reavivadas em meio *Potato Dextrose Agar* (PDA) para fungos, a fim de obter uma concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL (0,5 na escala Macfarlane), sendo incubadas por 24 horas à temperatura ambiente.

A Figura 8 mostra a microdiluição do OEHm em meio contendo as culturas fúngicas acima citadas.

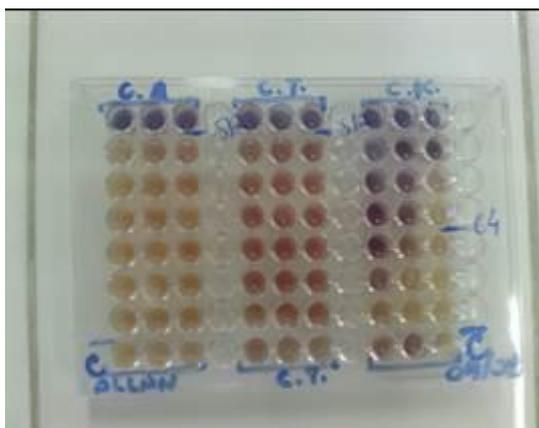


Figura 8: Microdiluição em placa

4.7 Avaliação da atividade moduladora do OEHm por contato gasoso

A modificação da atividade dos antibióticos pelos componentes voláteis do OEHm foi determinada pelo método do contato a vapor (modificado por INOUE, TAKIZAWA e YAMAGUCHI, 2001). A avaliação foi realizada em triplicata, utilizando as soluções contendo 50, 25, 12,5 e 6,25 % dos óleos essenciais diluído em DMSO.

O efeito dos constituintes voláteis dos óleos essenciais foi avaliado de acordo com a interferência desses componentes com antibióticos aminoglicosídeos como: tobramicina, amicacina e gentamicina (Figura 9A). O ensaio foi realizado com as linhagens *Staphylococcus aureus* ATCC12692, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442, *Bacillus cereus* ATCC33018 e o isolado clínico de *Escherichia coli* (EC27). O ensaio foi acompanhado de um controle contendo somente antibióticos e outro contendo o tensoativo (DMSO) utilizado para diluição dos óleos. Após 24 h foram realizadas as leituras para verificar a interferência dos componentes voláteis com os antibióticos resultando em sinergismo (aumento da atividade do antibiótico) ou antagonismo (diminuição da atividade do antibiótico) (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Os discos dos antibióticos adicionados nas placas foram utilizados para determinar as alterações no diâmetro do halo de inibição (sinergismo ou antagonismo) frente às linhagens analisadas na presença do óleo essencial (Figura 9B e 9C). A realização dos testes antibacterianos e antifúngicos está determinado de acordo com a Figura 10.

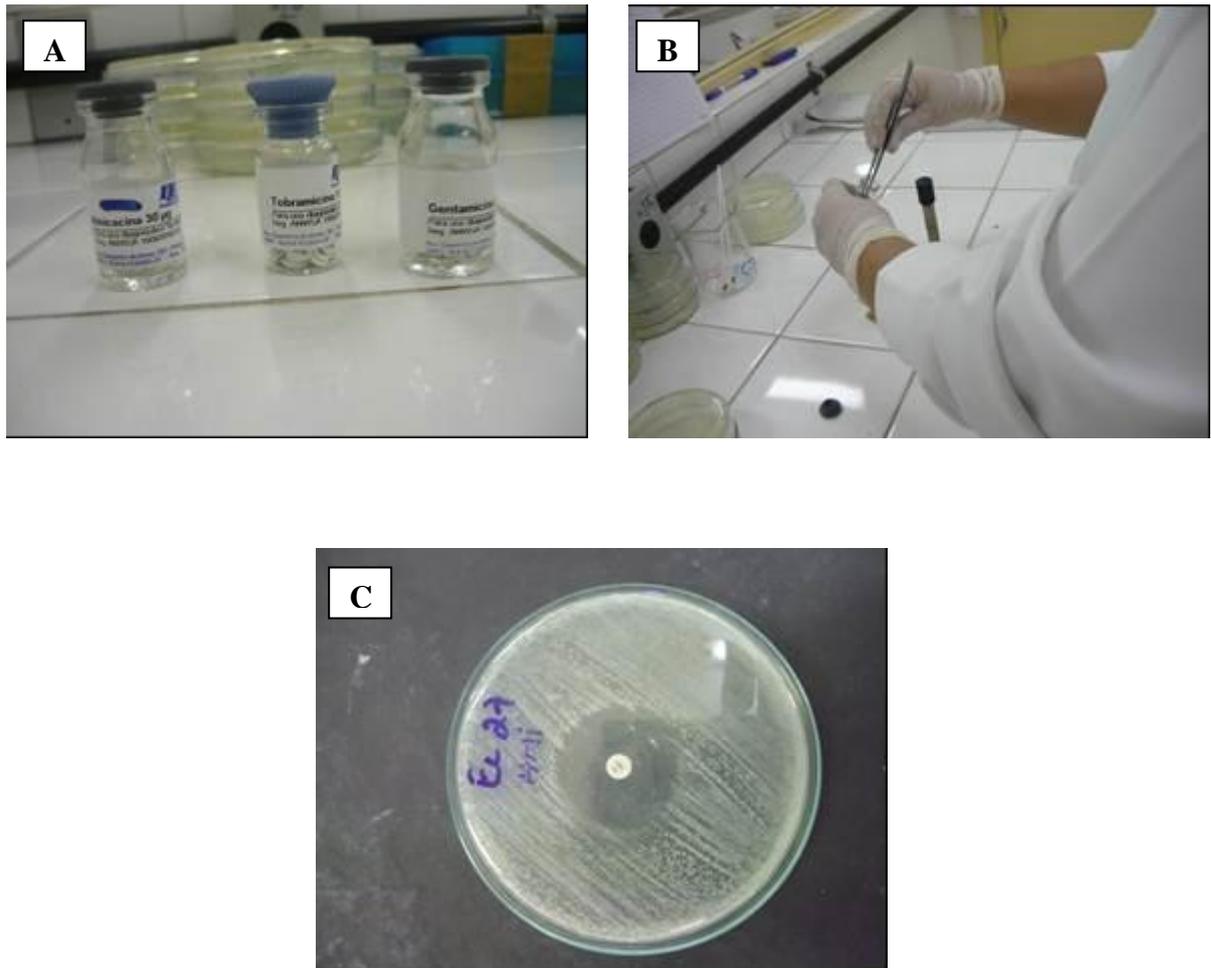


Figura 9: (A) Amicacina, Tobramicina e Gentamicina; (B) Utilização dos antibióticos aminoglicosídeos. (C) Halo de inibição (Fonte: do autor)

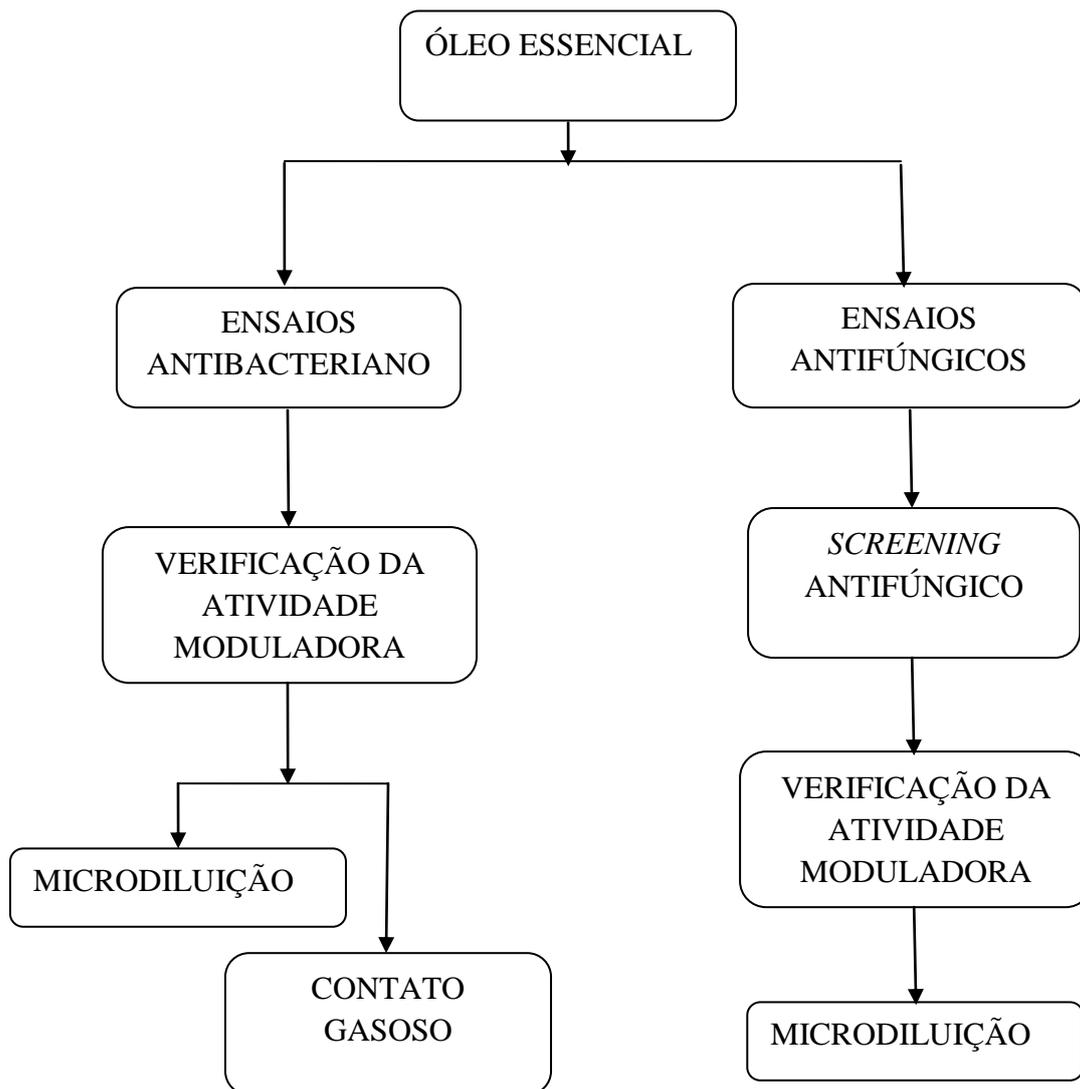


Figura 10: Fluxograma de realização de testes após a extração e identificação do óleo essencial.

4.8 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão, avaliados estatisticamente usando-se a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. O programa aplicado foi o Microcal Origin 6,0 para Windows, onde as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise da composição química do óleo essencial

O óleo essencial obtido por hidrodestilação forneceu um rendimento de 0,78% e sua análise por CG/EM permitiu a identificação de 24 constituintes representando 92,13%, com ocorrências exclusivas de monoterpenos e sesquiterpenóides.

Os constituintes majoritários foram biciclogermacreno (10,60%) e o *trans*-cariofileno (9,21%), constituintes como óxido cariofileno (7,47%), 1,8-cineol (7,01%), δ -3-careno (6,88%), ledeno (5,41%) apresentaram um percentual intermediário.

Silveira e Pessoa (2005) coletaram folhas e capítulos florais de *H. martiusii* na Chapada do Araripe, sul do Ceará. A identificação dos constituintes químicos das folhas e dos capítulos florais da espécie foi realizada por CG/EM e os compostos majoritários identificados nas folhas foram o 1,8-cineol (24,3%) e o delta-3-careno (22,5%). Confrontando os dados com a identificação realizada na pesquisa em questão, os autores não constataram a presença do *trans*-cariofileno, o biciclogermacreno representou cerca de 6,3% dos constituintes totais.

Já no estudo de Costa *et al.*(2005) identificaram através de CG/EM os constituintes químicos do óleo essencial de *H. martiusii*, na pesquisa o 1,8-cineol e o δ -3-careno foram os constituintes majoritários. Ambos os constituintes também foram encontrados na avaliação do OEHm nesta pesquisa.

Poucos trabalhos fazem referência ao uso do OEHm, o extrato etanólico é a forma mais frequentemente utilizada. De forma geral, as pesquisas com a espécie, relatam que a atividade

antimicrobiana foi a mais avaliada, seguida por citotoxicidade (COUTINHO *et al.*, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2006).

Como, por exemplo, no estudo de Calixto (2006), onde biciclogermacreno, um dos compostos majoritários no OEHm, e também constituinte dos óleos essenciais de *Lantana camara L.* e *Lantana montevidensis* foi avaliado quanto à atividade antibacteriana e de toxicidade usando larvas de *Artemia salina*. Os resultados constataram considerável atividade antibacteriana contra linhagens padrão de *Proteus vulgaris* e *Escherichia coli*.

Araújo *et al.*(2003) também identificaram o 1,8-cineol (24,27%) e o δ -3-careno (22.5%) como principais representantes e avaliou a atividade inseticida, desta forma os resultados desta pesquisa corroboram com dados da literatura.

Os estudos de Griffin *et al.* (1999) chamam a atenção para o fato dos sesquiterpenos oxigenados, como o óxido de cariofileno (um dos compostos majoritários observado no OEHm), demonstrarem uma atividade antimicrobiana maior que os hidrocarbonetos sesquiterpênicos, devido à capacidade que apresentam de formar pontes de hidrogênio desestabilizando a membrana celular.

Gallucci *et al.*(2006) observaram que compostos terpênicos (eugenol, timol e carvacrol) de óleos essenciais de plantas nativas da Argentina, apresentaram efeito inibitório contra linhagens de *S. aureus* meticilina-resistentes.

Diversos constituintes encontrados no OEHm, também já foram identificados em várias espécies do gênero, como *H. suaveolens* (DONAHAYE *et al.*, 2004), onde foi detectado o 1,8-cineol como principal constituinte. Em pesquisa com o óleo essencial das folhas de *H. fruticosa* Salzm. ex Benth., o biciclogermacreno e o 1,8-cineol foram os majoritários (Menezes *et al.*, 2007). O β -cariofileno, 1,8-cineol e terpinoleno foram os constituintes de maior percentual em estudo realizado por Natatinon, Chowwanapoonpohn e Okonogi (2007) que constataram atividade antibacteriana, antifúngica e antioxidante.

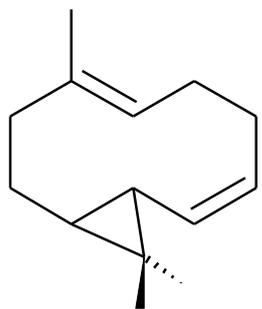
Os constituintes voláteis do óleo de *H. martiusii* estão listados na Tabela 1. A maioria destes constituintes apresenta uma ampla variedade de atividades biológicas como antibacteriana (COUTINHO *et al.*, 2010; BUSSMANN *et al.*, 2010) citotóxica (ZELLNER *et al.*, 2009), antiparasitária (ZAPATA *et al.*, 2009; ESTEVEZ *et al.*, 2007), antifúngica (RAIMUNDO *et al.*, 2011; DONAHAYE *et al.*, 2004) e antiviral (ILBOUDO *et al.*, 2010).

Tabela 1. Constituição química do óleo essencial das folhas de *H. martiusii* Benth.

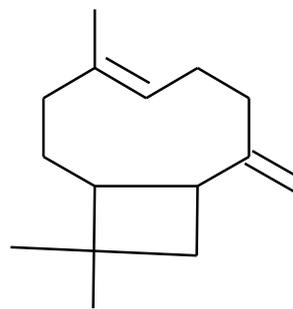
Constituintes	Tempo de Retenção (min)	(%)
δ- 3-careno	9,59	6,88
1,8-cineol	10,65	7,01
Terpinoleno	12,99	1,63
Cânfora	16,35	2,66
<i>trans</i>-cariofileno	30,91	9,21
Aromadendreno	31,82	2,75
α -humuleno	32,71	2,21
germacreno D	34,05	3,83
Ledeno	34,58	5,41
Biciclogermacreno	34,84	10,60
Torreiol	35,83	2,66
δ -cadineno	36,00	3,12
Valenceno	36,81	1,57
β -guaiano	37,04	2,42
isolongifol-8-ol	37,97	2,39
Espatulenol	38,81	1,93
óxido cariofileno	39,02	7,47
Globulol	39,20	2,16
Epiglobulol	39,61	2,34
Guaiol	39,85	3,35
10-epi- α -eudesmol	41,54	1,36
α -eudesmol	42,83	3,71
epóxi-aromadendreno	42,91	3,02
δ -guaiano	43,41	2,44
TOTAL		92,13

Obs.: Os constituintes destacados em negrito correspondem aos compostos majoritários.

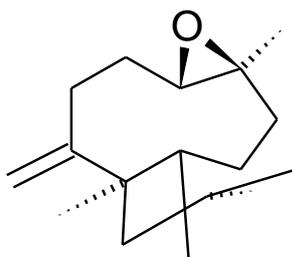
Quadro 5 : Estruturas químicas dos constituintes majoritários presentes nos óleos essenciais das folhas de *H. martiusii* Benth.



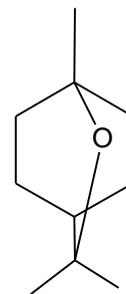
Biciclogermacreno



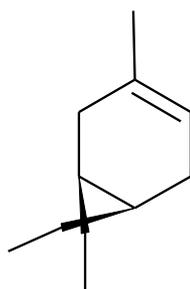
trans-cariofileno



Óxido de Cariofileno



1,8-cineol



δ -3-careno

5.2 Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição

Para realização dos testes de microdiluição, o óleo foi diluído em DMSO obtendo uma solução de concentração 10 µg/mL. Um ensaio controle utilizando apenas DMSO foi realizado, mas nenhuma atividade antibacteriana ou moduladora foi verificada.

A Tabela 2 mostra o efeito antibacteriano do OEHm contra *E. coli* e *S. aureus*, linhagens padrão e multirresistentes, e apenas as linhagens padrão para *B. cereus* e *P. aeruginosa*. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram atividade antibacteriana para a cepa padrão de *S. aureus* com CIM de 512 µg/mL, no entanto contra a linhagem multirresistente deste Gram-positivo não se observou resultados satisfatórios com CIM ≥ 1024 µg/mL. Os resultados das CIMs mostraram-se mais efetivos contra as linhagens padrão de *E. coli* com 512 µg/mL e para multirresistente com 64 µg/mL.

Na avaliação da atividade frente à linhagem de *B. cereus* ATCC33018 observou-se uma CIM de 256 µg/mL e de 512 µg/mL frente à linhagem de *P. aeruginosa* ATCC15442.

A literatura demonstra menor susceptibilidade dos microorganismos Gram-negativos aos agentes antimicrobianos (BURT, 2004; HOLLEY e PATEL, 2005), a justificativa seria pela propriedade dos componentes voláteis dos óleos essenciais atuarem primariamente sobre a membrana celular e os microorganismos supracitados, como por exemplo *S. aureus* e *B. cereus* serem envolvidos por um envelope complexo dificultando a sua atuação (STAMMATI *et al.*, 1999). Em relação aos resultados da literatura e da pesquisa em questão percebeu-se certa divergência, já que o melhor resultado de CIM foi observado contra linhagens de *Escherichia coli*, um Gram-negativo, assim como demonstra a Tabela 2.

Tabela 2. Atividade antibacteriana e concentração inibitória mínima (CIM) do OEHm e de antimicrobianos padrões ($\mu\text{g/mL}$).

Óleo e Antibióticos	<i>E. coli</i> EC27	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>S. aureus</i> SA358	<i>S. aureus</i> ATCC12692	<i>B. cereus</i> ATCC33018	<i>P. aeruginosa</i> ATCC15442
OEHm	64	512	≥ 1024	512	256	512
Amicacina	64	256	256	256	128	128
Neomicina	32	256	128	128	256	64
Gentamicina	16	64	64	64	256	64
Canamicina	16	256	128	64	256	128

A literatura relata à utilização da espécie *H. martiusii* Benth. como agente antibacteriano, utilizando principalmente extrato etanólico. Observou-se também atividade antibacteriana, porém em menor intensidade, contra linhagens de *E. coli* e *P. aeruginosa* (COSTA *et al.*, 2008).

Santos *et al.* (2008) demonstraram que o óleo essencial da espécie *Hyptis pectinata* apresentou resultados com atividade antibacteriana considerável, especialmente em Gram-positivos, onde organismos de elevada patogenicidade, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis* foram sensíveis ao óleo essencial obtido das folhas do gênero *Hyptis*. Óxido de cariofileno, β -cariofileno e calamusenona foram os constituintes majoritários. A atividade antifúngica foi constatada especialmente em linhagens de *Candida albicans*.

Assim como descrito no levantamento bibliográfico da espécie *H. martiusii*, nenhum estudo foi encontrado destacando o efeito antimicrobiano do óleo essencial da espécie. No entanto, é importante destacar que várias outras espécies do gênero *Hyptis* mostraram-se eficazes para tal fim. Alguns dos constituintes mais frequentemente encontrados nas espécies de *Hyptis*, que comprovadamente apresentam efeito antimicrobiano, também estavam presentes no OEHm, como destacado no tópico 5.1.

5.3 Efeito modulador por contato direto

A atividade moduladora com antibióticos aminoglicosídeos (amicacina, canamicina, neomicina e tobramicina), teve o intuito de avaliar uma possível interação entre o produto natural e os antimicrobianos através do contato direto, a fim de verificar a atividade sinérgica ou antagônica. Todas as linhagens foram também submetidas ao teste de modulação.

Os aminoglicosídeos são potentes antibióticos bactericidas que inibem a síntese protéica de bactérias suscetíveis, pela segmentação do ribossomo bacteriano 30S e que podem causar danos à membrana por alterar sua composição e permeabilidade, alterando as concentrações iônicas da célula e interferindo nos processos de replicação e transcrição (FOURMY *et al.*, 1996).

O aumento dos casos de resistência a essa classe de antibiótico é amplamente reconhecido como um grave ameaça à saúde (JANA e DEB, 2006; COUTINHO *et al.*, 2008; COUTINHO *et al.*, 2009). Os principais mecanismos de resistência das bactérias aos aminoglicosídeos são efluxo ativo, alteração do alvo do antibiótico por mutação ou inativação enzimática e alteração da permeabilidade da bactéria à droga (BROOKS, 2000).

Produtos naturais de origem vegetal podem alterar o efeito de antibióticos, seja aumentando a atividade antibiótica ou revertendo à resistência (COUTINHO *et al.*, 2008). Vários relatos envolvendo interferência mostram que diferentes combinações antibióticas testadas *in vitro* e aplicado na cl são comuns, é o caso da combinação da penicilina com a gentamicina. Nesta associação uma ação sinérgica contra *Enterococos faecalis* ocorre, porque a penicilina causa danos na parede celular o suficiente para aumentar a entrada do aminoglicosídeo. Porém quando administradas separadamente, nenhuma das duas drogas é efetiva (LEVINSON e JAWERT, 2005, p. 91).

Oliveira *et al.* (2005) avaliaram a interferência do uso associativo de antimicrobianos com o óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham, *Plectranthus amboinicus* Lour Spr., *Conyza*

bonariensis L. e *Eucalyptus citriodora* Hook. Observaram interferências tanto sinérgicas quanto antagônicas, principalmente no tratamento frente a Gram-positivos como *S. aureus* e *S. epidermidis*, por outro lado, frente às linhagens Gram-negativas praticamente não foi observado alteração nos halos de inibição.

Assim como o estudo realizado por Oliveira *et al.* (2005) a pesquisa por contato direto com o óleo essencial de *H. martiusii* demonstrou um efeito antagônico principalmente no tratamento de *S. aureus* 358, um Gram-positivo. Destacando as associações com amicacina e neomicina, onde o efeito antagônico foi bastante acentuado quando comparado à ação individual destes antimicrobianos.

De acordo com a Tabela 3, o efeito sinérgico não foi perceptível em nenhuma das associações, pois não houve amplificação satisfatória da atividade dos antimicrobianos.

Percebeu-se também um efeito antagônico, quando da associação da amicacina com o óleo essencial frente às linhagens de *P. aeruginosa* ATCC15442, no entanto o efeito foi menos intenso em comparação a *S. aureus* 358.

As linhagens de *E.coli* ATCC2592, *E. coli* 27 e *B. cereus* ATCC33018 não se mostraram suscetíveis à ação do óleo essencial combinado com os aminoglicosídeos. Não foi perceptível nenhuma modificação do efeito dos antibióticos testados, seja sinérgica ou antagônica.

Tabela 3. Avaliação da atividade moduladora do OEHm frente às linhagens bacterianas ($\mu\text{g/mL}$).

Bactérias	AMI		GEN		NEO		KAN	
	OE	CONT	OE	CONT	OE	CONT	OE	CONT
<i>E. coli</i> ATCC25922	32	32	64	64	64	16	64	64
<i>E. coli</i> 27	32	32	64	64	16	16	32	32
<i>S. aureus</i> ATCC12692	128	128	64	64	128	16	128	128
<i>S. aureus</i> 358	256	4	128	64	512	16	128	16
<i>P. aeruginosa</i> ATCC15442	64	16	512	512	32	32	128	128
<i>B. cereus</i> ATCC33018	32	32	64	64	16	16	64	64

OE: Óleo essencial; CONT: Controle; AMI: Amicacina; GEN: Gentamicina; NEO: Neomicina; KAN: Canamicina

De acordo com El-Kattan (2001) os terpenos são substâncias que aumentam a absorção transmembrana tanto de drogas lipofílicas quanto de drogas hidrofílicas. No entanto este efeito não foi perceptível na associação por contato direto do OEHm com aminoglicosídeos.

Lambert (2002) relata que as bactérias Gram-positivas apresentam maior suscetibilidade devido à presença de uma membrana que não restringe a penetração de moléculas tóxicas, enquanto as Gram-negativas possuem um sistema altamente complexo de barreira formado pela membrana externa constituída por fosfolipídios, lipopolisacarídios e proteínas (porinas) que conferem um alto grau de impermeabilidade aos antimicrobianos.

Da mesma forma que o óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala*, o OEHm, foi identificado em sua totalidade por terpenóides, em uma mistura de monoterpenos e

sesquiterpenos. No trabalho citado os autores identificaram o biciclogermacreno (22,47%) como componente majoritário. O óleo não apresentou atividade antibacteriana contra linhagens de *S. aureus*, no entanto apresentou uma boa atividade moduladora quando combinada ao norfloxacino, onde o CIM do antibiótico foi reduzido em quatro vezes (CALIXTO, 2005). Desta forma isso pode representar um possível efeito sinérgico do OEHm com outras classes de antimicrobianos, pois a pesquisa avaliou a interação apenas com aminoglicosídeos.

Os resultados do efeito modulador por contato direto, divergem da modulação por contato a vapor, onde o efeito sinérgico foi observado principalmente diante de Gram-positivos.

5.4 Efeito modulador por contato a vapor

Souza *et al.*(2010) avaliaram a modificação da atividade de antimicrobianos aminoglicosídeos por contato gasoso, a pesquisa indicou bons resultados para linhagens multirresistentes. Sesquiterpenos predominaram sobre os monoterpenos, o biciclogermacreno com 19,42% foi um dos constituintes majoritários do óleo essencial de *Lantana camara* Briq. também encontrado no óleo essencial de *H. martiusii*.

Na avaliação dos testes antimicrobianos para contato gasoso, contra cepas de *S. aureus* ATCC12692 percebeu-se que os constituintes químicos foram determinantes para o aumento do halo de inibição de todos os antimicrobianos utilizados, principalmente quando na utilização de amicacina, onde se observou um incremento de 328,9% na concentração de 50% do OEHm, como mostra a Tabela 4. Da mesma forma os resultados na concentração de 25% aumentaram a zona de inibição em 171,7%, demonstrando que o OEHm apresentou

sinergismo com o antimicrobiano amicacina, no entanto, este sinergismo não foi observado quando em concentrações menores.

Ainda em relação ao *S. aureus* ATCC12692, percebeu-se que todas as concentrações testadas juntamente com o antimicrobiano tobramicina tiveram um efeito sinérgico, no entanto, com a amicacina e gentamicina, houve aumento do halo de inibição apenas nas concentrações de 50 e 25%, mas com resultados expressivos. Em relação à linhagem multirresistente de *S. aureus*, observou-se sinergismo apenas nas concentrações de 50 e 25%, e de forma menos intensa quando comparado com a linhagem padrão.

Santos *et al.* (2008) demonstraram que o óleo essencial da espécie *Hyptis pectinata* também apresentou atividade antibacteriana considerável, especialmente em Gram-positivos, onde organismos de elevada patogenicidade, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis* foram sensíveis ao óleo essencial obtido das folhas do gênero *Hyptis*.

De todas as linhagens testadas a *P. aeruginosa* ATCC15442 foi uma das espécies bacterianas que se mostrou menos suscetível a ação do OEHm em combinação com os aminoglicosídeos (Tabela 4), mas ainda assim percebeu-se um incremento de 60% no halo de inibição quando na utilização de amicacina como antibiótico, tendo desta forma a concentração de 50% como a mais efetiva.

Gallucci *et al.*(2006) observaram que compostos terpênicos de óleos essenciais de plantas nativas da Argentina, apresentaram efeito inibitório contra linhagens de *S. aureus* meticilina-resistentes.

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão da média, avaliados estatisticamente usando-se análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, utilizando o programa Microcal Origin 6,0 para Windows, onde as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Tabela 4: Modificação da atividade dos antibióticos e constituintes voláteis do óleo essencial de *H. martiusii* por contato gasoso (mm).

Bactérias	Antibiótico	N. TRA	DMSO	OEHm 50%	OEHm 25%	OEHm 12%	OEHm 6%
<i>S.aureus</i> ATCC12692	Controle GENT	16,3±0,6	16,7±0,6	60,0±0,5 ^a	60,1±0,6 ^a	16,3±0,8	16,3±0,5
	aumento (%)	-	-	268,1	268,7	-	-
	Controle AMI	17,3±0,6	17,3±0,6	74,2±0,0 ^a	47,0±0,5 ^a	17,3±0,7	17,3±0,0
	aumento (%)	-	-	328,9	171,7	-	-
	Controle TOBRA	15±0,7	15,3±0,7	57±0,3 ^a	34±0,0 ^a	25±0,3 ^a	18±0,0 ^a
	aumento (%)	-	-	280	126,7	66,7	20
<i>P.aeruginosa</i> ATCC15442	Controle GENT	14,3±0,6	14±0,0	17±0,7 ^a	14,3±0,4	14,3±0,8	14,3±0,0
	aumento (%)	-	-	18,9	-	-	-
	Controle AMI	15±0,0	15,3±0,6	24±0,3 ^a	15±0,4	15,2±0,7	15±0,5
	aumento (%)	-	-	60	-	1,3	-
	Controle TOBRA	16±0,0	16±0,3	18±0,0 ^b	17±0,7	17±0,7	17±0,7
	aumento (%)	-	-	12,5	6,3	6,3	6,3
<i>E.coli</i> 27	Controle GENT	15±0,0	15±0,0	21±0,0 ^a	17±0,0 ^a	15±0,0	15±0,0
	aumento (%)	-	-	40	13,3	-	-
	Controle AMI	17±0,7	16,5±0,3	31±0,0 ^a	22±0,0 ^a	17±0,0	17±0,0
	aumento (%)	-	-	82,4	29,4	-	-
	Controle TOBRA	15±0,7 ^a	15±0,0	27±0,0 ^a	19±0,0 ^a	15±0,0	15±0,0
	aumento (%)	-	-	80	26,7	-	-
<i>B.cereus</i> ATCC33018	Controle GENT	18±0,3	18,3±0,0	23±0,0 ^a	18±0,0	18±0,0	18±0,0
	aumento (%)	-	-	27,8	-	-	-
	Controle AMI	18±0,0	18±0,0	32±0,0 ^a	23±0,0 ^a	18±0,0	18±0,0
	aumento (%)	-	-	77,8	27,8	-	-
	Controle TOBRA	14±0,0	14,5±0,7	24±0,0 ^a	19±0,3 ^a	18±0,0 ^a	18±0,0 ^a
	aumento (%)	-	-	71,4	35,7	28,6	28,6
<i>S.aureus</i> 358	Controle GENT	22,0±0,5	22,0±0,5	26±0,3 ^a	24±0,0 ^a	22,0±0,5	22,0±0,5
	aumento (%)	-	-	18,2	9,1	-	-
	Controle AMI	25,0±0,5	25,0±0,5	35±0,5 ^a	27±0,4 ^b	25,0±0,5	25,0±0,5
	aumento (%)	-	-	40	8	-	-
	Controle TOBRA	25,5±0,6	25,5±0,6	34±0,3 ^a	30±0,0 ^a	25,5±0,6	25,5±0,6
	aumento (%)	-	-	33,3	17,6	-	-

	Controle GENT	17,0±0,0	17,0±0,0	20±0,2 ^a	19,2±0,2 ^a	17,0±0,0	17,0±0,0
	aumento (%)	-	-	17,6	12,9	-	-
<i>E. coli</i> ATCC25922	Controle AMI	20,5±0,5	20,5±0,5	21±0,0	21±0,0	20,5±0,5	20,5±0,5
	aumento (%)	-	-	2,4	2,4	-	-
	Controle TOBRA	17,0±0,0	17,0±0,0	30,0±0,4 ^a	28±0,2 ^a	17,0±0,0	17,0±0,0
	aumento (%)	-	-	76,5	64,7	-	-

N.TRA: Não Tratado; OEHm: óleo essencial de *H. martiusii*.

Médias seguidas de letras iguais, na coluna, não diferem significativamente entre si (n=3, p<0,05, teste de Tukey). Médias seguidas de letras diferentes, na linha, diferem significativamente quando comparado com o respectivo controle, para cada microorganismo (n=3, p<0,05 ANOVA). Os resultados são expressos como média ±DP.

A modificação da atividade do antibiótico para as linhagens de *E. coli* 27 (multirresistente) foi observado um incremento de 82,4 e 80% quando tratado com amicacina e tobramicina, respectivamente, na concentração de 50%. As concentrações que mais se mostraram efetivas foram as de 50 e 25%. Em relação à linhagem de *E. coli* ATCC25922 foi visto efeito sinérgico quando em contato com o antimicrobiano tobramicina (incremento de 76,5% e 64,7% em zona de inibição).

Calixto (2005) avaliou a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Lantana camara* L. e *Lantana montevidensis*. Os resultados constataram considerável atividade contra linhagens padrão de *Proteus vulgaris* e *Escherichia coli*.

Levando-se em consideração os constituintes químicos do OEHm, percebe-se que o biciclogermacreno, um dos compostos majoritários nesta pesquisa, também se destacou como componente majoritário no estudo acima descrito.

A linhagem de *B.cereus* ATCC 33018, também representada na Tabela 4 apresentou um efeito sinérgico mais evidente quando tratado na concentração de 50% e com os

antimicrobianos amicacina e tobramicina, aonde o incremento chegou a 77,8% quando em contato com a amicacina. As outras concentrações tiveram relevância apenas quando em contato com a tobramicina, com 28,6% de incremento no halo de inibição na concentração de 6%.

Asekun *et al.*(1999) relatam que o óleo essencial das folhas de *Hyptis suaveolens* apresentou significativo efeito antimicrobiano contra Gram-positivos (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*).

O efeito antimicrobiano do óleo essencial de *Hyptis pectinata* foi testado diante de diversos microorganismos, os melhores resultados foram evidenciados frente às linhagens Gram-positivas, como o *Bacillus subtilis*. Os compostos majoritários do óleo essencial foram o óxido de cariofileno, beta-cariofileno e calamusenona (SANTOS *et al.*, 2008).

A maioria das pesquisas utiliza o contato direto como forma de determinar a existência ou não de sinergismo, por exemplo, Coutinho *et al.*, (2010) confirmaram a existência do efeito sinérgico do extrato etanólico de *H. martiusii* contra *Staphylococcus aureus* metilina-resistente através da metodologia de contato direto. No entanto, por meio de contato gasoso Rodrigues (2009) realizou pesquisa onde se podem observar resultados satisfatórios quando utilizando o óleo essencial de *Croton zehntneri* Pax et Hoffm contra linhagens bacterianas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. A atividade da gentamicina, um dos aminoglicosídeos utilizados também na pesquisa com *H. martiusii*, foi modificada. No estudo o autor utilizou o óleo essencial da Euphorbiaceae (*Croton zehntneri*) onde constatou um incremento de 42,8% na formação do halo de inibição quando o mesmo foi utilizado juntamente com a gentamicina contra linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442.

Da mesma forma Sousa *et al.*, (2010) avaliaram a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lantana montevidensis* Briq. (Verbenaceae) através da metodologia por contato gasoso. O autor utilizou duas linhagens multirresistentes (*S. aureus* 358 e *E. coli* 27) e

percebeu amplificação do poder dos aminoglicosídeos quando combinados ao óleo essencial de *Lantana camara*.

O efeito sinérgico do OEHm foi observado, onde ocorreu inibição do crescimento das linhagens de *Staphylococcus aureus* ATCC12692 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442. A atividade dos antibióticos (gentamicina e amicacina) foi amplificada frente às duas linhagens. É importante ressaltar que a amicacina juntamente com a ação do óleo essencial incrementou o halo de inibição na ordem de 102% quando submetidos contra as linhagens de *P. aeruginosa*.

Os óleos essenciais afetam diretamente a atividade da cadeia respiratória e desta forma a produção de energia. No entanto, os mecanismos dos óleos essenciais para inibição de microorganismos podem envolver diferentes formas de ação (NICOLSON *et al.*, 1999).

Murari *et al.*(2008) relatam que o efeito de alguns terpenóides sobre a captação de oxigênio e a fosforilação oxidativa da célula bacteriana são fatores que também contribuem para a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais.

Diferentes resultados foram observados na atividade moduladora antimicrobiana quando comparados os contatos direto e gasoso. Esta diferença pode ser explicada pela degradação espontânea dos constituintes instáveis presentes no óleo essencial em contato com o ar, oxidação ou óxido-redução de grupos aldeído e ligações insaturadas, e rearranjo do processo de relacionamento de álcoois terpenos podem possuir mais atividade do que os hidrocarbonetos originais, o que implica em uma contribuição significativa para a bioatividade (INOUYE *et al.*, 2001).

Kashiwagi *et al.*, (2010) apresentaram alterações em 44 dos compostos do óleo yuzu (*Citrus junos* Sieb.) durante o armazenamento a 25° C, mediante processo oxidativo. Este estudo demonstra que o biciclogermacreno, o hidrocarboneto sesquiterpeno principal do óleo, praticamente desapareceu e converteu-se em (-)-espatulenol. Considerando que o óxido de

cariofileno, biciclogermacreno (presentes no OEHm) e espatulenol tem sido relatados por apresentar notável atividade antibacteriana sobre *S. aureus*, a presença de substâncias em altas concentrações no óleo obtido das plantas coletadas na primavera pode estar relacionados à atividade antibacteriana apresentada por esse óleo (CHINOUE *et al.*, 2004).

Os resultados aqui apresentados sugerem que o óleo essencial de *H. martiusii* detêm constituintes químicos voláteis que modificados pelo contato com o ar podem ser capazes de suprimir o crescimento de microorganismos patógenos como, por exemplo, *S. aureus*, uma bactéria patogênica do sistema respiratório.

Os dados obtidos neste trabalho podem estimular mais pesquisas sobre aspectos fitoquímicos, toxicológicos e farmacológicos de produtos naturais isolados das folhas de *H. martiusii* Benth, a fim de apoiar a sua possível utilização na terapia racional de antimicrobianos e resistência a múltiplas drogas antibacterianas.

5.5 Concentrações inibitória mínima e efeito modulador antifúngico por contato direto

Para avaliação da atividade antifúngica foi realizado teste para determinar a CIM. De acordo com a Tabela 5, o melhor resultado para este teste foi em relação à *Candida krusei* ATCC6438, onde o MIC foi de 64 µg/ml, mesmo resultado observado frente ao antifúngico cetoconazol em relação à mesma linhagem.

O OEHm também apresentou resultados semelhantes aos dos antifúngicos padrão, quando testado frente às linhagens de *Candida albicans* ATCC40006.

Moreira *et al.*(2010) observaram atividade antifúngica na utilização de óleo essencial de *H. suaveolens* Poit. extraído das folhas. Alguns dos principais componentes identificados através de cromatografia gasosa foram, trans-beta-cariofileno, germacreno e beta-pineno.

Da mesma forma o 1,8-cineol foi identificado em óleo essencial de *Hyptis mutabilis*, onde o mesmo apresentou-se como um promissor agente antifúngico (ZAPATA *et al.*, 2009). De acordo com o autor, o efeito antifúngico do óleo essencial de *Hyptis mutabilis* pode está relacionado à grande presença deste constituinte, um terpeno que corresponde ao composto majoritário da mesma.

Na pesquisa realizada com OEHm observou-se que os constituintes majoritários também foram identificados em trabalho realizado por Natatinon (2007), onde o mesmo detectou atividade antifúngica com o óleo essencial de *H. suaveolens*; 1,8-cineol e β -cariofileno, ao lado do sabineno e α -terpinoleno apresentaram-se como compostos majoritários, os dois primeiros assim como na pesquisa descrita também foram majoritários no OEHm. O extrato etanólico de *H. suaveolens* também apresentou atividade antifúngica, na mesma pesquisa, várias partes da planta participaram da preparação do extrato (MBATCHOU, ABDULLATIF E GLOVER, 2010).

Donahaye *et al.* (2004) identificaram constituintes majoritários como o 1,8-cineol, β -pineno e β -cariofileno em pesquisas com o óleo essencial de *H. suaveolens*, nessa mesma pesquisa foi comprovada a atividade antifúngica da *Lamiaceae*.

A atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) foi determinada em análise bioautográfica onde se detectou a inibição de *Cryptococcus neoformans* por frações ricas em 1,8-cineol, linalol e óxido de cariofileno, todos monoterpenos (VERHOEFF, 1999). O 1,8-cineol e óxido de cariofileno foram identificados no OEHm.

Em algumas espécies da família *Lamiaceae* detectou-se atividade antifúngica tanto em óleo essencial como em extrato, por exemplo, na espécie *Hyptis ovalifolia* (SOUZA *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2003).

Tabela 5: Atividade antifúngica e Concentração inibitória mínima (CIM) do OEHm e de antifúngicos padrões ($\mu\text{g/mL}$).

Óleo e Antifúngicos	<i>Candida albicans</i> ATCC 40006	<i>Candida. krusei</i> ATCC 6438	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 40042
OEHm	512	64	512
Fluconazol	512	128	64
Cetoconazol	512	64	256

No teste de atividade moduladora por contato direto, o OEHm apresentou efeito antagônico quando em contato com os antifúngicos fluconazol e cetoconazol, de acordo com a tabela 6.

Tabela 6: Atividade moduladora do óleo essencial de *H. martiusii*

	<i>C. albicans</i> 32 (ATCC40006)	Controle	<i>C. krusei</i> 16 (ATCC 6438)	Controle	<i>C. tropicalis</i> (ATCC 40042)	Controle
Fluconazol	≥ 1024	512	≥ 1024	128	≥ 1024	64
Cetonazol	≥ 1024	512	≥ 1024	64	≥ 1024	256

Controle: Controle

As pesquisas com produtos naturais que apresentam atividade antifúngica são bem mais restritas quando comparado à atividade antibacteriana. O estudo mostrou que o CIM apresentou bons resultados quando comparado aos antifúngicos utilizados no mercado, no entanto na modulação por contato direto foram observados efeitos antagônicos.

Desta forma seria imprescindível a realização de mais pesquisas com espécies do gênero *Hyptis* a fim de avaliar uma possível atividade antifúngica nas mesmas em especial a *H. martiusii*.

CONCLUSÕES

6.0 CONCLUSÕES

O OEHm apresentou um rendimento de 0,78%, a análise química por CG/EM constatou a presença de mono e sesquiterpenos, tendo como constituintes majoritários o trans-cariofileno, biciclogermacreno, óxido cariofileno e 1,8-cineol com pequena proporção de variação destes constituintes químicos.

O óleo essencial de *H. Martiusii* demonstrou atividade antimicrobiana, pelo método de microdiluição em caldo, frentes às linhagens bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas ATCC e isolados clínicos.

Na avaliação da atividade moduladora por contato direto, não foi observado efeito sinérgico. A associação dos aminoglicosídeos (amicacina e neomicina) com o óleo essencial de *H. martiusii* demonstrou um efeito antagônico principalmente quando no tratamento de *S. aureus* 358, o efeito antagônico também foi perceptível frente à linhagem de *P. aeruginosa*. Quanto às demais linhagens não houve alteração no efeito do antibiótico.

Pelo método de contato a vapor, a amicacina foi o antibiótico que apresentou maior atividade sinérgica com o OEHm frente a todas as linhagens bacterianas testadas, com melhores resultados para *S. aureus* ATCC12692.

A avaliação da atividade antifúngica pelo método de microdiluição em caldo demonstrou um melhor resultado frente às linhagens de *Candida krusei* com resultado igual ou inferior a 64 µg/mL. Entretanto, na avaliação da atividade moduladora por contato direto percebeu-se um efeito antagônico do OEHm e o antifúngico padrão fluconazol, o que demonstra que outros estudos devem ser realizados a fim de avaliar outros constituintes do óleo essencial.

Este estudo demonstra será espécie *H. martiusii* uma possível alternativa para a indústria farmacêutica na busca por produtos com atividade antibacteriana e até mesmo

antifúngica. No entanto, é necessário que se façam mais estudos com componentes isolados ou até mesmo com componentes minoritários combinados que possam contribuir sinergicamente para o efeito biológico.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. Identification of Essential Oils components by Gas Chromatography / Quadruple Mass Spectroscopy. **Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL**, 1991.

AHMED B. I., YUSUF S. R., AND SULE H. Effects of application rates of some plant materials on the control of red flour beetle, *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) on stored millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) Plant powders efficacy on red flour beetle **Journal of Biopesticides**, 3(3): 610 - 616 (2010)

ALICE CB. **Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognósticos**. Canoas: Ulbra.

ALLANA K. L. SANTOS, JOSÉ G. M. COSTA, IRWIN R. A. MENEZES, ISAAC F. CANSANÇÃO, KARLA K. A. SANTOS, EDINARDO F. F. MATIAS, E HENRIQUE D. M. COUTINHO Antioxidant activity of five Brazilian plants used as traditional medicines and food in Brazil **Pharmacognosy Magazine** Oct–Dec; 6(24): 335–338, 2010.

ALLANA K. L. SANTOS, JOSÉ G. M. COSTA, IRWIN R. A. MENEZES, ISAAC F. CANSANÇÃO, KARLA K. A. SANTOS, EDINARDO F. F. MATIAS, AND HENRIQUE D. M. COUTINHO Antioxidant activity of five Brazilian plants used as traditional medicines and food in Brazil **Pharmacogn Mag.** 2010 Oct–Dec; 6(24): 335–338.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; ALBUQUERQUE, U. P. Check-list of the family *Lamiaceae* in Pernambuco, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**: 45 (3): 343-353, 2002.

AMARAL FMM, RIBEIRO MNS, BARBOSA-FILHO JM, REIS AS, NASCIMENTO FRF, MACEDO RO Plants and chemical constituents with giardicidal activity. **Rev Bras Farmacogn** 16(Supl.): 696-720, 2006.

ANDRADE, A. M., OLIVEIRA, J. P. R., SANTOS A. L. L. M., FRANCO C. R. P., ANTONIOLLI A. R., ESTEVAM C. S., THOMAZZI S. M. Preliminary study on the anti-

inflammatory and antioxidant activities of the leave extract of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., *Lamiaceae* Brazilian **Journal of Pharmacognosy** 20(6): 962-968, Dez. 2010

ARAÚJO CCE. ; LIMA MAS. ; MONTENEGRO R.C. ; NOGUEIRA M. ; COSTA-LOTUFO LV. ;PESSOA C. ; ODORICO M M ; SILVEIRA ER. Cytotoxic abietane diterpenes from *H. martiusii* Benth . **Journal of biosciences** vol. 61, no3-4, pp. 177-183, 2006.

ARAÚJO E.C.C.; SILVEIRA E.R.; LIMA M.A.S., ANDRADE NETO, M.; ANDRADE I.L. AND LIMA M.A.A. Insecticidal Activity and Chemical Composition of Volatile Oils from *H. martiusii* Benth **J. Agric. Food Chem.**, 51 (13), pp 3760–3762, 2003.

ARRIGONI-BLANK, R. SILVA-MANN, D.A. CAMPOS, P.A. SILVA, A.R. ANTONIOLLI, L.C. CAETANO, A.E.G. SANT'ANA, A.F. BLANK Morphological, agronomical and pharmacological characterization of *Hyptis pectinata* (L.) Poit germplasm M.F. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy** 15(4): 298-303, Out./Dez. 2005

ASEKUN, O.T.; EKUNDAYO, O.; ADENIYI, B.A. (1999). Antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* leaves. **Fitoterapia**, 70: 440-442

BALUNAS, M.J.; KINGHON A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life sciences**, v.78, p. 431-441, 2005.

BARBERÁN, F. A. T.; BARKMEIJER, R. J. G.; GIL, M. I.; HARBONRNE, J. B.; **PHYTOCHEMISTRY**, 27, p. 2631, 1988.

BORDIGNON, S. A. L. O Gênero *Hyptis* Jacq. (Labiatae) no Rio Grande do Sul. **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul. 1990, p. 123.

BRANDT, A.P.. Avaliação in vivo do efeito hipocolesterolêmico e toxicológico preliminar do extrato bruto hidroalcoólico e decocção da *Vitex megapotamica* (Spreng) Moldenke (*V. montevidensis* Cham.). **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa, v. 19, n. 2a, June 2009 .

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 48, de 16 março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1030&Word=> Acesso em 07/09/2010.

BUENO AX.; MOREIRA A.T.S., SILVA F.T., ESTEVAM CS., MARCHIORO M. Effects of the aqueous extract from *Hyptis pectinata* leaves on rodent central nervous system. **Rev. bras. farmacogn.** 16(3): 317-323, 2006 .

BUSSMANNA R.W., G. MALCA-GARCÍA B, A. GLENNA, D. SHARONA, G. CHAITC, D. DÍAZB, K. POURMANDD, B. JONATD, S. SOMOGYE, G. GUARDADOF, C. AGUIRREF, R. CHANF, K. MEYERA, A. KUHLMANA, A. TOWNESMITHA, J. EFFIO-CARBAJALB, F. FRÍAS-FERNANDEZB, M. BENITOB Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies *Journal of Ethnopharmacology* 132 (2010) 101–108.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial proprieties and potential applications in foodos- a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 4, p. 223-253, 2004.

BUENO-SÁNCHEZ J. G., MARTÍNEZ-MORALES J. R., STASHENKO E. E., RIBÓN W. Anti-tubercular activity of eleven aromatic and medicinal plants occurring in Colombia **Biomédica** vol.29 no.1 Bogotá Jan./Mar. 2009

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.131 – 134, 2005.

CAMPOS, A.R.; ALBUQUERQUE, F.A.; RAO, V.S.; MACIEL, M.A.; PINTO, A.C. Investigations on the antinoceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* Leaves in mice. **Fitoterapia**. V. 73, n.2, p. 116-120, 2002.

CARLINI, E.A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.502, p.501 – 512, 2003.

CAVALCANT B.C., MOURA D.J., ROSA R.M., MORAES M.O., ARAUJO E.C.C., LIMA M.A.S., SILVEIRA E.R., SAFFI J., HENRIQUES J.A.P., PESSOA C. E COSTA-LOTUFO L.V. Genotoxic effects of tanshinones from *H. martiusii* in V79 cell line Food and Chemical Toxicology Volume 46, Issue 1, January 2008, Pages 388-392 **Pharmaceutical Biology** 2010, Vol. 48, No. 9, Pages 1002-1006.

CHATTOPADHYAY, A.; CAPLAN, D.J.; SLADE, G.D.; SHUGARS, D.C.; TIEN, H.C.; PATTON, L.L. Risk indicators for oral candidiasis and oral hairy leukoplakia in HIV-infected adults. **Community. Dent. Oral. Epidemiol.**, 33: 35-44, (2005).

CHINOU I B., BOUGATSOS C., PERDETZOGLOU D. Composition and Antibacterial activity of the essential oil of the cultivated species of *Helichrysum amorginum* growing in Amorgos **Journal of Essential Oil Research** 16, 243-245, (2004)

CHUKWUJEKWUA J.C., SMITH P. B, COOMBESC P.H., MULHOLLAND C D.A., VAN STADEN J. Antiplasmodial diterpenoid from the leaves of *Hyptis suaveolens* **Journal of Ethnopharmacology** 102 295–297, (2005).

CLEELAND, R.; SQUIRES, E., Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. (Ed.) **Antibiotics in laboratory medicine**. 3 ed. p.739-787, 2003.

COLE, M. D. (1992), The significance of the terpenoids in the Labiate. In-Advances in Labiate Science, ed. Royal Botanic Gardens KEW, Whitstable, pp 315- 324.

COSTA, A.C. et al.. . Antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* L. (*Lamiaceae*) against bacterial multiresistant strains isolated from nosocomial patients. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa, v. 19, n. 1b, Mar. 2009 .

COSTA J.G.M., RODRIGUES F.F.G., ANGÉLICO E.C., SILVA M.R., MOTA M.L., SANTOS N.K.A. *et al.* Chemical-biological study of the essential oils of *H. martiusii*, *Lippia sidoides* and *Syzigium aromaticum* against larvae of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Rev. bras. farmacogn.** 15(4): 304-309, 2005 .

COSTA J.G.M., RODRIGUES F.F.G., ANGÉLICO E.C., SILVA M.R., MOTA M.L., SANTOS N.K.A., CARDOSO A.L.H., LEMOS T.L.G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *H. martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti* **Revista Brasileira de Farmacognosia** 15(4): 304-309(2005).

COSTA-LOTUFO L.V., ARAÚJO E.C.C., LIMA M.A.S., MORAES M.E.A., PESSOA C., SILVIERA E.R., MORAES M.O., Antiproliferative effects of abietane diterpenoids isolated from *H. martiusii* Benth (Labiatae) **Pharmazie** Volume: 59 Issue: 1 Cover date: January 2004 Page(s): 78-79

COUTINHO H.D.M.; COSTA J.G.M. ; LIMA E. O. ; FALCÃO-SILVA V.S. E SIQUEIRA-JÚNIOR J.P. *In vitro* interference of *H. martiusii* Benth. & chlorpromazine against an aminoglycoside - resistant *Escherichia coli* **Indian J Med Res** 129, pp 566-568, 2009.

COUTINHO H.D.M.; COSTA J.G.M. ; LIMA E. O. ; FALCÃO-SILVA V.S. E SIQUEIRA-JÚNIOR J.P. *In vitro* phototoxic activity of *Eugenia jambolana* L. and *H. martiusii* Benth. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** Volume 96, v.1, Pages 63-65, 2009.

COUTINHO H.D.M., COSTA J.G.M., LIMA E. O., SIQUEIRA-JÚNIOR E J. P. Additive effects of *H. martiusii* Benth with aminoglycosides against *Escherichia coli* **Indian J Med Res** 131, pp 106-108, 2010.

COUTINHO, H.D.M., COSTA, J.G.M., SIQUEIRA-JR, J.P. & LIMA, E.O.. Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 2010.

DAS P.T.K.; SAHOO S.; SETHI R.; NAYAK P.S.; NAYAK S.; JOSHI A. Phytochemical and pharmacological investigation of the protective effect of plant *Hyptis suaveolens* against duodenal ulceration **Journal of Global Pharma Technology**. Vol 1, No 1, 2009.

DONAHAYE, E.J., NAVARRO, S., BELL, C., JAYAS, D., NOYES, R., PHILLIPS, T.W.. Bioactivity of essential oil from *Hyptis suaveolens* against storage mycoflora [EDS.] (2007) PROC. INT. CONF. CONTROLLED ATMOSPHERE AND FUMIGATION IN STORED PRODUCTS, GOLD-COAST AUSTRALIA. FTIC Ltd. **Publishing, Israel**. pp. 99-116 8-13th August 2004

DRISCOLL JA, BRODY SL, KOLLEF MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Drugs**, 67:351-368, (2007).

EL-KATTAN, A. F.; ASBILL, C. S.; KIM, N.; MICHNIAK, B. B.; **Int. J. Pharm.** 2001, 215, 229.

ESTEVEZ, Y., CASTILLO, D., AREVALO, J., ROJAS, R., ALBAN, J., DEHARO, E., BOURDY, G., SAUVAIN, M., Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology** 114, 254–259. 2007.

FACEY P.C., PORTER R. B. R., REESE P. B. E WILLIAMS L. A. D. Biological Activity and Chemical Composition of the Essential Oil from Jamaican *Hyptis verticillata* Jacq. **J. Agric. Food Chem.**, 2005, 53 (12), pp 4774–4777

FAGUNDES-NETO, U. e SCALETSKY, I.C. A. The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition. Sao Paulo **Med. J.** vol.118, n.1, pp. 21-29, 2000.

FALCÃO, D. Q. Estudo Químico e Farmacológico de Quatro Espécies de *Hyptis* do Estado do Rio Grande do Sul - **Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas**. Rio de Janeiro, junho de 2003, p. 33.

FALUDI AA, ZATZ HP, ARAÚJO DB, BERTOLAMI MC. Como diagnosticar e tratar dislipidemias. **Rev Bras de Med** 5: 174-180, 2005.

FERREIRA, M. A. *et al.*, Antimicrobial activity of *Aegiphila sellowiana* Cham., *Lamiaceae*, against oral pathogens. **Rev. bras. farmacogn.**, Curitiba, v. 20, n. 2, May 2010 .

FOGLIO, M.A; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M.O.; RODRIGUES, R.A.F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Revista eletrônica Multiciência**, V. 7, p.32, 2006.

FOURMY, D.; RECHT, M. I.; BLANCHARD, S. C.; PUGLISI, J. D. Structure of the A-site of *E.coli* 16 S rRNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. **Science**, v. 274, n. 5291, p. 1367-13771, 1996.

FOWLER Jr., J.E. & STAMEY, T.A. - Studies of introital colonization in women with recurrent urinary infections. VII. The role of bacterial adherence. **J. Urol.**, 117: 472-476, 1977.

GARCÍA-RODAS ROCÍO, GONZALEZ-CAMACHO FERNANDO, RODRÍGUEZ-TUDELA JUAN LUIS, CUENCA-ESTRELLA MANUEL, AND ZARAGOZA OSCAR The interaction between *Candida krusei* and murine macrophages results in multiple outcomes including intracellular survival and escape from killing **Infect. Immun**, 2011.

GHANNOUM, M.A. Candida: a causative agent of an emerging infection. **JID. Symposium. Proceedings.**, 6: 188-196, (2001).

GRASSIA PAOLO, TOMA'S S. URI'AS REYESB, SILVIO SOSAC, AURELIA TUBAROC, OTMAR HOFERD, AND KARIN ZITTERL-EGLESEERA Anti-Inflammatory Activity of Two Diterpenes of *Hyptis suaveolens* from El Salvador, **Z. Naturforsch.** 165-170 (2006).

GUGNANI, H.C.; BECKER, K.; FEGELER, W.; BASU, S.; CHATTOPADHYA, D.; BAVEJA, U.; SATYANARAYANA, S.; KALGHATGI, T.; MURLIDHAR, A.

Oropharyngeal carriage of *Candida* species in HIV-infected patients in India. **Mycoses.**, 46: 281-288, (2003).

GRIFFIN, S. G.; WYLLIE, S.G.; MARKHAM,J.L.; LEACH, D.N. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 14, n. 2, p. 322-327, 1999.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemistry**, v. 11, p.137-147, 2000.

HARLEY RM. Revision of generic limits in *Hyptis* Jacq (Labiatae) and its allies. **Bot J Linn Soc** 98: 87-95, 1988.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 273-292, 2005.

ILBOUDO Z. A, DABIRÉ L.C.B. B, NÉBIÉ R.C.H. C, DICKO I.O. D, DUGRAVOT S. E, CORTESERO A.M. E, SANON A. Biological activity and persistence of four essential oil stowards the main pest of stored cowpeas, *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera:Bruchidae) **Journal of Stored Products Research** 46, 124-128, 2010.

INOUYE, S.; TAKIZAWA, T.; YAMAGUCHI, H. A ntibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 5, p. 565-573, 2001.

ISOBE T., DOE M., MORIMOTO Y., NAGATA K., AND OHSAKI A., The Anti-*Helicobacter pylori* Flavones in a Brazilian Plant, *Hyptis fasciculata*, and the Activity of Methoxyflavones **Biol. Pharm. Bull.** 29(5) 1039—1041 (2006)

JAAFARI, ABDESLAM; MOUSE, HASSAN AIT; RAKIB, EL MOSTAPHA; MBAREK, LAHCEN AIT; TILAOU, MOUNIR; BENBAKHTA, CHOUAIB; BOULLI, ABDELALI;

ABBAD, AZIZ; ZYAD, ABDELMAJID. Chemical composition and antitumor activity of different wild varieties of Moroccan thyme **Rev. bras. farmacogn**; 17(4):477-491, out.-dez. 2007.

JANA, S.; DEB, J. K. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 70, n. 2, p. 140-150, 2006.

JAVADPOUR, M. M.; JUBAN, M.M.; LO, W.C.; BISHOP, S.M.; ALBERTY, J.B.; COWELL, S.M.; BECKER, C.L.; MCLAUGHLIN, M. L. New antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 16, p. 3107-3113, 1996.

JESSE Y. A., SULE H. AND PHILIP C. B. Doruwa (*Parkia biglobosa*) fruit husk and *Hyptis* (*Hyptis spicigera*) leaves for controlling root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*) in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill C.V.) **Journal of Tropical Agriculture** 44 (1-2): 83-85, 2006.

JUAN GABRIEL BUENO-SÁNCHEZ, JAIRO RENÉ MARTÍNEZ-MORALES, ELENA E. STASHENKO, WELLMAN RIBÓN Anti-tubercular activity of eleven aromatic and medicinal plants occurring in Colombia **Biomédica** 2009;29:51-60

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. Plant Systematics. A phylogenetic approach. Inglaterra, **Sinauer Associates Inc.**, p. 383, 1999..

KASHIWAGI TAKEHIRO, THI LAN PHI NGUYEN, SAWAMURA MASAYOSHI. Compositional Changes in Yuzu (*Citrus junos*) Steam-Distilled Oil and Effects of Antioxidants on Oil Quality during Storage. **Food Sci. Technol. Res.**, 16 (1), 51 – 58, 2010

KIRKPATRICK, P. Stitching together naturally. **Nature**, v.1, p.748, 2002.

KONEMAN, M. D. Diagnóstico Microbiológico - **Texto e Atlas colorido** - 6ª. Edição, Guanabara Koogan, 2008.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n.3, p. 453 – 462, 2001.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 7. ed. São Paulo: Artmed, 2005, p. 91.

LORENZI H.; MATOS F. J. A.; **Plantas Medicinais no Brasil, Nativas e Exóticas, Nova Odessa: Instituto Plantarum**, Rio de Janeiro, 2002.

LU, Y.; ZHAO, Y. P.; WANG, Z. C.; CHEN, S. Y.; FU, C. X. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Actinidia macrosperma* from China. **Natural Product Research**, v. 21, n. 3, p. 227-233, 2007.

MBWAMBO, Z. H.; MOSHI, M. J.; MASIMBA, P. J.; KAPINGU, M. C.; NONDO, R. S. Antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of extracts of *Terminalia brownii* roots and stem. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, n. 9, p. 1-5, 2007.

MATOS FJA. *Plantas Medicinais: Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil*. 2ed. Fortaleza: **Imprensa Universitária- UFC**, 2000.

MBATCHOU V.C., ABDULLATIF S. AND GLOVER R. Phytochemical Screening of Solvent Extracts from *Hyptis suaveolens* LAM for Fungal Growth Inhibition Pakistan Journal of Nutrition 9 (4): 358-361, 2010 **Asian Network for Scientific Information**, 2010

MELO, N.R.; TAGUCHI, H.; JORGE, J.; PEDRO, R.J.; ALMEIDA, O.P.; FUKUSHIMA, K.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Oral Candida flora from Brazilian Human Immunodeficiency Virus-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.**, 99: 425-431, (2004).

MEISTER A, BERNHARDT G, CHRISTOFFEL V, BUSCHAUER A 1999. Antispasmodic activity of *Thymus vulgaris* extract on the isolated guinea-pig trachea: discrimination between drug and ethanol effects. **Planta Med** 65: 512-516.

MELO G.B. ; SILVA R.L.; MELO ; LIMA S.O.; ANTONIOLLI A.R.; , CASTRO-E-SILVA T.; MARCASSA L.G.; BAGNATO V.S.; ZUCOLOTO S. AND RAMALHO L.N.Z., Enhancement of Liver Regeneration by the Association of *Hyptis pectinata* with Laser Therapy Digestive Diseases and Sciences Volume 50, Number 5, 949-954, 2006.

MENEZES, F. S. Base química de tendências filogenéticas em Lamiiflorae. **Tese de Mestrado**, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 94, 1994.

MENEZES IGOR A.C., MARQUES MAXSUEL S., SANTOS THIAGO C., DIAS KELLYANE S., SILVA ALINE B.L., MELLO IDERJANE C.M., LISBOA ANA C.C.D., ALVES PÉRICLES B., CAVALCANTI SÓCRATES C.H., MARÇAL ROSILENE M., ANTONIOLLI ANGELO R. Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis fruticosa* in mice **Fitoterapia** 78 (2007) 192–195

MOREIRA A. C. P.; LIMA E. O.; WANDERLEY P. A.; CARMO E. S.; SOUZA E. L. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit leaves essential oil against *Aspergillus* species **Brazilian Journal of Microbiology** 41: 28-33(2010)

MOREIRA I. J. A., MORENO M. P. N., FERNANDES M. F. G., FERNANDES J. B., MOREIRA F. V., ANTONIOLLI A. R. *et al.*, Vasorelaxant effect of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., *Lamiaceae*, dichloromethane extract on rat mesenteric artery. **Rev. bras. farmacogn.** Nov 20(5): 762-765, 2010.

MOREIRA, A. C. P. et al.. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 41, n. 1, Mar. 2010 .

MURARI, A. L.; CARVALHO, F. H.; HEINZMANN, B. M.; MICHELOT T. M.; HÖRNER, R.; MALLMANN, C. A. Composição e atividade antibacteriana dos essenciais de *Senecio crassiflorus* var. *crassiflorus*. **Química Nova**, v. 31, n.5, p. 1081-1084, 2008.

MUSA, A. K Laboratory evaluation of the toxicity of methanolic extract of african bush tea seed (*Hyptis suaveolens* poit.) for the control of cowpea beetle (*Callosobruchus maculatus* Fabricius). **Journal of Tropical Agriculture**, Food, Environment and Extension Volume 7 Number 2 May 2008 pp. 114 -117

NANTITANON W.; CHOWWANAPOONPOHN S.; OKONOGIM S. Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Hyptis suaveolens* Essential Oil Scientia **Pharmaceutica** (Sci. Pharm.) 75, 35-46, 2007.

NASCIMENTO E.M., FURLONG J., PIMENTA D.S., PRATA, M.C.A. Efeito anti-helmíntico do hidrolato de *Mentha villosa* Huds. (*Lamiaceae*) em nematóides gastrintestinais de bovinos **Ciência Rural**, Vol. 39, No 3, 2009.

NASCIMENTO PFC; ALVIANO WS; NASCIMENTO, ALC; SANTOS PO; ARRIGONI-BLANK MF.; JESUS RA; AZEVEDO VG; ALVIANO DS; BOLOGNESE AM; TRINDA RC. *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-Streptococcus mutans activity. **Oral Diseases** Volume 14, Issue 6, pages 485–489, 2008.

NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Villanova, **NCCLS**, v. 17, n. 9, 2002.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M., Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NGO BUM E., TAIWE G.S., NKAINSA L.A., MOTO F.C.O., SEKE ETET P.F., HIANA I.R., BAILABAR T., ROUYATOU, PAPA SEYNI, RAKOTONIRINA A., RAKOTONIRINA S.V. Validation of anticonvulsant and sedative activity of six medicinal plants **Epilepsy & Behavior** 14 (2009) 454–458

NICOLSON, K., EVANS, G., O TOOLE, P.W. Potentiation of methicillin activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. **FEMS Microbiol. Lett.** 179, 233–239, 1999.

NIERO R. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In Chechinel Filho V, Bresolin TMB. (org). Ciências químico-farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: Univall, p.150-215, 2003.

NOUDJOU F; KOUNINKI H; NGAMO L.S.T.; MAPONMESTSEM P.M.; NGASSOUM M.; HANCE T; HAUBRUGE E. ; MALAISSE F. ; MARLIER M. ; LOGNAY G.C. Effect of site location and collecting period on the chemical composition of *Hyptis spicigera* Lam. an insecticidal essential oil from North-Cameroon. The Journal of essential oil research, vol. 19, no6, pp. 597-601, 2007.

NUCCIA MARCIO, COLOMBO ARNALDO L. B Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals **Volume 58, Issue 1, Pages 77-82, 2007.**

OKIGBO, R.N., OKEKE, J.J. AND MADU, N.C. Larvicidal effects of *Azadirachta indica*, *Ocimum gratissimum* and *Hyptis suaveolens* against mosquito larvae **Journal of Agricultural Technology** 2010 Vol. 6(4): 703-719

OLIVEIRA RAG, LIMA EO, SOUZA EL, VIEIRA WL, FREIRE KRL, TRAJANO VN, LIMA IO, SILVA-FILHO RN. Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-*Candida* activity of some clinically used antifungals. **Rev Bras Farmacogn** 17: 186-190, 2007.

OLIVEIRA RAG, LIMA EO, VIEIRA WL, FREIRE KRL, TRAJANO VN, LIMA IO, SOUZA EL, TOLEDO MS, SILVA-FILHO RN Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Rev Bras Farmacogn** 16: 77-82, 2006.

OLIVEIRA, C. M. A. DE ET AL.. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Hyptis ovalifolia* Benth. (*Lamiaceae*). **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 15, n. 5, Oct. 2004.

OTHIRA JO, ONEK LA, DENG LA, OMOLO EO Insecticidal potency of *Hyptis spicigera* preparations against *Sitophilus zeamais* (l.) and *Tribolium castaneum* (herbst) on stored maize grains **African Journal of Agricultural Research** Vol. 4 (3), pp. 187-192, March 2009

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método de avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.17, n.1, p. 345-353, 2007.

PAIVA, E. A. S.; MACHADO, S. R.; BRAZ. **Arch. Biol. Techn.**, 48, 147, 2005.

PORTE, A.; GODOY, R. L. de O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* l.): propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 193- 210, 2001.

RABELO, A. F. L., Estudo da toxicidade hepática da trans-desidrocrotonina(t-DCTN), um diterpeno obtido de *Croton cajucara* Benth., e de estratégias farmacológicas preventivas em modelos animais. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Ceará, 2008.

RAVINDRASINGH RAJPUT¹, UJJAL BOSE¹, MANJUSHA BARMA¹, LAXMINARAYAN A UDUPA, VINUTA BHAT, NAMITA RAO Evaluation of *Hyptis suaveolens* for anti--oxidant property and reversal of dexamethasone supression in dead space wound model **International Journal of Pharmaceutical science and biotechnology**.

RAYMUNDO L.J.R.P., GUILHON C., ALVIANO D., MATHEUS M.E., ANTONIOLLI A. R., CAVALCANTI S..H., ALVES P.B., ALVIANO C., FERNANDES P. D. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (l.) Poit essential oil **Journal of Ethnopharmacology** No. of Pages 8, 2011.

RAYMUNDO L.J.R.P., GUILHONA C.C., ALVIANO D. S., MATHEUS M. E., ANTONIOLLI A. R., CAVALCANTI S.C.H., ALVES P. B.A, ALVIANO C. S., FERNANDES P.D., Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil **Journal of Ethnopharmacology** 2011

REBELO, M.M. *et al.*, Antioxidant capacity and biological activity of essential oil and methanol extract of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa, v. 19, n. 1b, 2009.

REYES AEL. Árvores Frutíferas Tarumã *Mitex montevidensis* Cham. 2003

RICHARD H, BENJILALI B, BANQUOUR N, BARITAUX O Etude de diverses huiles essentielles de thym du Maroc. *Lebensm-Wiss Technol* 18: 105-110, 1985.

RODRIGUES, F.F.G., COSTA, J.G.M., COUTINHO, H.D.M. Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. **Phytomedicine**, 2009.

SAHIN, F.; GULLUCE, M.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; SOKMEN, M.; POLISSIOU, M.; AGAR, G.; OZER, H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v. 15, p.549-557, 2004.

SANTOS, A.A. CARVALHO, I.A. MEDEIROS, P.B. ALVES, M. MARCHIORO, A.R. Cardiovascular effects of *Hyptis fruticosa* essential oil in rats M.R.V. *Antoniolli Fitoterapia* 78, 186–191, (2007).

SANTOS, P.O. *et al.*, Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. **Quím. Nova**, vol.31, n.7, pp. 1648-1652, 2008.

SAMPAIO-SANTOS, M. I.; KAPLAN, M.A.C., Superordem corniflorae: química, etnofarmacologia e farmacologia. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 20, n. 6, Dec. 1997

SCHECHNER V, NOBRE V, KAYE KS, LESHNO M, GILADI M, ROHNER P, HARBARTH S, ANDERSON DJ, KARCHMER AW, SCHWABER MJ Gram-negative bacteremia upon hospital admission: when should *Pseudomonas aeruginosa* be suspected? **Clin Infect Dis**, 48:580-586, (2009).

SEPTIMIO LR A fitoterapia baseada em ervas medicinais do Cerrado. Brasília: SIPE, Ministério da Cultura, 1994.

SILVA A.B.L., DIAS K. S., MARQUES M. S., MENEZES I.A.C., SANTOS T.C., MELLO I.C.M. ET AL.. . Evaluation of the analgesic effect and acute toxicity of the aqueous extract of *Hyptis fruticosa* (Salmz. ex Benth.). **Rev. bras. farmacogn.** 16(4): 475-479, 2006 .

SILVA, A.C.; SALES, N.L.P.; ARAUJO, A.V.; CALDEIRA JÚNIOR, C.F. Efeito *in vitro* de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Pen **Ciênc. agrotec.**, 33: 1853-1860, 2009.

SILVA, CG., RAULINO, RJ., CERQUEIRA, DM., MANNARINO, SC., PEREIRA, MD., PANEK, AD., SILVA, JFM.,| MENEZES, FS., ELEUTHERIO, ECA., *In vitro* and *in vivo* determination of antioxidant activity and mode of action of isoquercitrin and *Hyptis fasciculata* **Phytomedicine** Vol. 16, no. 8, pp. 761-767. Aug 2009.

SILVA C.G., HERDEIRO R.S., MATHIAS C.J., PANEK A.D., SILVEIRA C.S., RODRIGUES V.P., RENN´O M.N., FALCÃO D.Q., CERQUEIRA D.M., MINTO A.B.M., NOGUEIRA F.L.P., QUARESMA C.H., SILVA J.F.M., MENEZES F.S., ELEUTHERIO E.C.A. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants *Pharmacological Research* 52 (2005) 229–233.

SOUZA LKH ; OLIVEIRA CMA; FERRI PH ; OLIVEIRA JJG; SOUZA JAH; FERNANDES OFL ; SILVA MRR Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** Volume:98 Issue:7 / 963-965, 2003.

SOUZA LKH, OLIVEIRA CMA, FERRI PH, SANTOS SC, OLIVEIRA JÚNIOR JG, MIRANDA ATB. Antifungal properties of Brazilian cerrado plants. **Braz. J. Microbiol.** ; 33(3): 247-249, 2002.

SOUSA E.O., RODRIGUES F.F.G., COUTINHO H.D.M., CAMPOS A.R., LIMA S.G. AND COSTA J.G.M. Chemical Composition and Aminoglycosides Synergistic Effect of *Lantana montevidensis* Briq. (Verbenaceae) Essential Oil, **Rec. Nat. Prod.** 5:1 60-64, 2010.

STAMMATI, A.; BONSI, P.; ZUCCO, F.; MOEZELAAR, R.; ALAKOMI, H. L.; VON WRIGTH, A. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 813-823, 1999.

TACHAKITTIRUNGROD AND SOMBAT CHOWWANAPHOONPOHN Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils from *Hyptis suaveolens* and *Alpinia galanga* Growing in Northern Thailand Suganya CMU. **J. Nat. Sci.** (2007) Vol. 6(1). Pages 31-42

TEPE B, SOKMEN M, AKPULAT HA, DAFERERA D, POLISSIOU M, SOKMEN A. Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. **J Food Eng** 66: 447-454, 2005.

THULER, L.C.S.; VELASCO, E.; MARTINS, C.A.S. e D'ASSUNCAO, MV. Determinantes de mortalidade em pacientes colonizados ou infectados por internados em um hospital do câncer. **Rev. Hosp. Clin.** vol.54, n.2, pp. 47-52, 1999.

TRIPATHI A.K. AND SHIKHA UPADHYAY. Repellent and insecticidal activities of *Hyptis suaveolens* (*Lamiaceae*) leaf essential oil against four stored-grain coleopteran pests **International Journal of Tropical Insect Science**, 29: 219-228, 2009.

TUON, FELIPE FRANCISCO; RUSSO, RACHEL E NICODEMO, ANTONIO CARLOS. Abscesso cerebral secundário à osteomielite frontal. **Rev. Inst. Med. trop.** S. Paulo 2006, vol.48, n.4, pp. 233-235.

WISPLINGHOFF H, BISCHOFF T, TALLENT SM, SEIFERT H, WENZEL RP, EDMOND MB Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clin Infect Dis**, 39:309-317, (2004).

VERHOEFF, J., BEAUJEAN, D., VLOK, H., BAARS, A., MEYLER, A. & WERKWN, V.D.C. A dutch approach to methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 18: 461-466, 1999.

YANG, Y.L.; LI, S.Y.; CHENG, H.H.; LO, H.J.; TSARY HOSPITALS. The trend of susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species from 1999 to 2002 in Taiwan. **BMC. Infect. Dis.**, 5: 99, (2005).

ZAPATA BIBIANA, CAMILO DURÁN, ELENA STASHENKO, LILIANA BETANCUR GALVIS, ANA CECILIA MESA ARANGO Actividad antimicótica, citotoxicidad y composición de aceites esenciales de plantas de la familia Labiatae Vol 41, No 3 (2009).

ZELLNER, B. D. ET AL.. . Screening of the odour-activity and bioactivity of the essential oils of leaves and flowers of *Hyptis Passerina* Mart. from the Brazilian Cerrado. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 20, n. 2, 2009.