



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 – PPBM

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Hyptis martiusii* BENTH E DE SEU COMPLEXO DE INCLUSÃO EM β -CICLODEXTRINA

THIAGO SAMPAIO DE FREITAS

**CRATO – CE
2017**

THIAGO SAMPAIO DE FREITAS

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Hyptis martiusii* BENTH E DE SEU COMPLEXO DE INCLUSÃO EM β -CICLODEXTRINA

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

Orientador:

Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

Freitas, Thiago Sampaio de.
F862a Atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de *Hyptis Martiusii* Benth e de seu complexo de inclusão em β -ciclodextrina/
Thiago Sampaio de Freitas. – Crato-CE, 2017
73p.; il.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do
Cariri – URCA.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

1. Óleo Essencial, 2. *Hyptis martiusii*, 3. β -CD; Complexo de
Inclusão, 4. Antibiótico, 5. Atividade antibacteriana, I. Título.

CDD: 615.321

THIAGO SAMPAIO DE FREITAS

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Hyptis martiusii* BENTH E DE SEU COMPLEXO DE INCLUSÃO EM β -CICLODEXTRINA

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

Dissertação apresentada em: ____/____/____

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho – URCA
(Orientador da Dissertação)

Profa. Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues – UNILEÃO
(Avaliador Externo)

Profa. Dra. Maria Flaviana Bezerra Morais Braga – URCA
(Avaliador Interno)

Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha – URCA
(Avaliador Interno – Suplente)

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Maria Bernadete Sampaio e ao meu pai Paulo Sérgio Furtado de Freitas pelo estímulo e “Bolsa de Estudo” eterna para a realização dos meus sonhos e projetos de vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho por ter aceito me orientar nesse meu percurso em busca da diplomação no grau de Mestre.

Aos meus amigos do LMBM por todas as conversas e momentos que tivemos, seja sobre estudos, seja em momentos de descontração. Agradeço a todos pelas dicas que me deram quando me “forçaram” a fazer uma pré-qualificação. Agradecimento especial para Corrinha (Maria do Socorro Costa), que tanto me ajudou nos testes da minha dissertação, perdendo feriados e horas de descanso.

Aos professores do Mestrado, que me passaram um pouco dos seus vastos conhecimentos em cada área.

Agradeço aos órgãos financiadores desta pesquisa, FUNCAP, URCA e FINEP.

Agradeço especialmente a minha esposa Denyse Alves Vieira, que nesses dois anos de curso foi minha fortaleza; e ao meu filho Matheus Alves de Freitas, minha motivação para o crescimento de vida e profissional.

“A ciência é mais do que um corpo de conhecimento. É uma maneira de pensar; Um modo de interrogar ceticamente o universo com uma boa compreensão da falibilidade humana”.

(Carl Sagan)

RESUMO

O óleo essencial de *Hyptis martiusii* Benth é terapeuticamente importante, apresentando compostos com atividades antibacterianas em sua composição, mas sua baixa solubilidade, bem como elevada volatilidade de seus compostos, podem limitar seu uso. A incorporação deste óleo em Ciclodextrinas, pode, desta forma, melhorar suas propriedades físico-químicas e antibacterianas, tornando-o um produto de uso viável contra a problemática da resistência bacteriana. Desta forma, o objetivo deste estudo foi comparar a atividade antibacteriana e moduladora do efeito antibiótico do complexo de inclusão do óleo essencial das folhas de *Hyptis martiusii* (OEHM) em β -Ciclodextrina, bem como do óleo essencial de *Hyptis martiusii* livre. A atividade antibacteriana direta das substâncias foi avaliada através da obtenção da CIM (Concentração Inibitória Mínima) dos compostos, em ensaios de microdiluição em caldo, contra cepas padrões e multirresistentes de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. As leituras foram evidenciadas pelo uso de resazurina. A modulação foi feita por comparações das CIM dos compostos combinados com norfloxacin, gentamicina e imipenem, contra cepas multirresistentes das bactérias citadas, utilizando uma concentração subinibitória das substâncias (CIM/8). Todas as substâncias testadas apresentaram valores para CIM maiores ou igual a 1024 $\mu\text{g/mL}$, com exceção do OEHM livre contra a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CIM = 32 $\mu\text{g/mL}$). O OEHM demonstrou sinergismo quando em associação com norfloxacin contra a cepa de *P. aeruginosa* 15, com redução da CIM de 8 para 2 $\mu\text{g/mL}$, e quando associado com gentamicina, para a cepa de *E. coli* 06, reduzindo a CIM de 32 para 20.15 $\mu\text{g/mL}$. O complexo OEHM/ β -CD demonstrou CIMs mais elevadas quando comparado com o OEHM livre. A β -CD demonstrou efeitos antagônicos quando associada com os antibióticos, contra todas as cepas. Como conclusão, o OEHM demonstrou notável atividade anti-estafilocócica de forma direta, bem como atividade modulatória contra cepas Gram-negativas. Entretanto, o complexo OEHM/ β -CD e a β -CD isolada não têm nenhuma atividade antibacteriana direta ou modulatória da atividade antibiótica.

Palavras-Chaves: Óleo Essencial; *Hyptis martiusii*; β -CD; Complexo de Inclusão; antibiótico; atividade antibacteriana.

ABSTRACT

The essential oil of *Hyptis martiusii* is important therapeutically, presenting compounds with antibacterial activity in its composition, but the low solubility, as well as high volatility of your components, may limit your use. The incorporation of this oil into cyclodextrins, can thus improve yours physicochemical and antibacterial properties, make it an product of viable use against the problem of bacterial resistance. Thus, the objective of this study was to compare the antibacterial and modulatory-antibiotic activity of essential oil of leaves *Hyptis martiusii* (EOHM) inclusion complex on β -CD, as well as on the essential oil of *Hyptis martiusii* alone. The direct antibacterial activity of the compounds was evaluated by MIC (Minimum Inhibitory Concentration) of the compounds in broth microdilution assays against standard and multiresistant strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Readings were evidenced by the use of resazurin. The modulation was made by comparisons of the MIC of the compounds combined with norfloxacin, gentamycin and imipenem against multi resistant strains of the aforementioned bacteria, using a sub inhibitory concentration of substances (MIC/8). All tested substances had values for MIC above 1024 mg/mL, with the exception of free EOHM against *Staphylococcus aureus* strain ATCC 25923 (MIC = 32 μ g/mL). EOHM demonstrated synergism when in combination with norfloxacin against the *P. aeruginosa* strain 15, with MIC reduction from 8 to 2 μ g/mL, and when associated with gentamicin, to the *E. coli* strain 06, reducing the MIC of 32 To 20.15 μ g/mL. The complex EOHM/ β -CD showed higher MICs when compared to EOHM free. β -CD demonstrated antagonistic effects when associated with antibiotics, against all strains. In conclusion, EOHM demonstrated remarkable anti-staphylococcal activity directly, as well as modulatory activity against Gram-negative strains. However, the complex EOHM/ β -CD and β -CD alone does not have any antibacterial direct or modulatory activity of antibiotic activity.

Keywords: Essential Oil; *Hyptis martiusii*; β -CD; Inclusion Complex; Antibiotic; antibacterial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição do Gênero <i>Hyptis</i> Jacq. (A) e da espécie <i>Hyptis martiusii</i> Benth. (B) no Brasil.	17
Figura 2 - Exsicata de <i>Hyptis martiusii</i> Benth. Inflorescência e Folhas.	19
Figura 3 - Vias biossintéticas dos terpenos.	26
Figura 4 - Estrutura tridimensional das ciclodextrinas.	28
Figura 5 - Conformação das ciclodextrinas naturais.	30
Figura 6 - Possíveis relações estequiométricas entre Hóspede/CD.	31
Figura 7 - Preparação dos inóculos.	40
Figura 8 - Preparação do eppendorf® para as placas de microdiluição.	40
Figura 9 - Microdiluição seriada (A) e Leitura da placa (B) após adição de rezasurina.	41
Figura 10 - Composição dos eppendorfs® utilizados no teste de modulação.	42
Quadro 1 - Principais constituintes químicos do óleo essencial de <i>Hyptis martiusii</i> .	20
Quadro 2 - Propriedades físico-químicas das Ciclodextrinas naturais.	30
Quadro 3 - Perfil de resistência das cepas utilizadas.	39

LISTA DE ABREVIATURAS

α -CD	α -Ciclodextrina
AMP-C	Adenosina Monofosfato-Cíclico.
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion Broth.
β -CD	β -ciclodextrina.
CA-ORSA	Acquired in the Community - <i>Oxacillin-resistant Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à oxacilina adquiridos na comunidade).
CD	Ciclodextrina;
CGTase	Ciclodextrina glucanotransferase
CI	Complexo de inclusão.
CIM	Concentração Inibitória Mínima.
DL	Dose Letal
DMADP	Difosfato alílico dimetil alilo
E.C.	<i>Escherichia coli</i> .
EEHM	Extrato Etanólico de <i>Hyptis martiusii</i>
ESBL	β -lactamases de espectro alargado.
ExPEC	E.C. patogênico extra-intestinal.
FPP	Difosfato de farnesila
GBIF	Global Biodiversity Information Facility
GGPP	Difosfato de geranil geranila
GPP	Difosfato de geranila
HCDAL	Herbário Carirense Dárdano de Andrade Lima
HIA	Heart Infusion Ágar
IDP	Difosfato de isopentenila
InPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênico intestinal.
ITU	Infecção do Trato Urinário.
LMBM	Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular.
M β Ls	metalo-beta-lactamases.
MEP	Metileritritol fosfato.
MVA	mevalonato.
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina.
OE	Óleo essencial.

OEHM	Óleo Essencial de <i>Hyptis martiusii</i> .
-OH	hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde.
ORSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a oxacilina.
P.A.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
S.A.	<i>Staphylococcus aureus</i> .
SF	Soro Fisiológico.
UFC	Unidades Formadoras de Colônia.
UTI	Unidade de Terapia Intensiva.
UV	Ultravioleta
γ -CD	γ -Ciclodextrina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS:	15
2.1 Objetivo Geral:	15
2.2 Objetivos Específicos:	15
3 REVISÃO DE LITERATURA:	16
3.1 Família Lamiaceae	16
3.1.1 Gênero <i>Hyptis</i>	16
3.1.2 <i>Hyptis martiusii</i> Benth	18
3.1.2.1 A espécie	18
3.1.2.2 Composição Química	19
3.1.2.3 Atividades Farmacológicas	22
3.2 Óleos Essenciais	25
3.2.1 Terpenos	25
3.2.1.1 Monoterpenos	27
3.2.1.2 Sesquiterpenos	27
3.3 Ciclodextrinas	28
3.3.1 Classificação das ciclodextrinas	29
3.3.2 Formação do Complexo	30
3.3.3 Estudos sobre atividade antibacteriana	32
3.4 Bactérias	34
3.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	34
3.4.2 <i>Escherichia coli</i>	35
3.4.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Material Vegetal	38
4.2 Compostos Químicos	38
4.3 Cepas Bacterianas	38
4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM):	39
4.5 Efeito Modulador dos Compostos na Atividade de Antibióticos de Uso Clínico:	41
4.6 Análise Estatística	42
5 RESULTADOS	43
6 DISCUSSÃO	50
6.1 Atividade Antibacteriana Direta	50
6.2 Efeito Modulador da Atividade Antibiótica:	51
7 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55
ANEXO A: PRODUÇÕES CIENTÍFICAS	71

1 INTRODUÇÃO

Com a introdução dos antibióticos no arsenal terapêutico utilizado contra as doenças infecciosas no início do século XX, doenças consideradas mortais passaram a ter tratamento e cura e os antibióticos ficaram conhecidos como drogas milagrosas (TORTORA et al., 2012), aumentando a expectativa de vida da população (BLAIR et al., 2014). Porém, o uso indiscriminado dessas substâncias contribuiu para o processo de seleção de cepas microbianas resistentes (SILVEIRA et al., 2006).

O problema gerado pelo aumento da resistência microbiana aos antibióticos torna-se ainda maior, devido não se restringir ao antibiótico específico prescrito, afetando também a ação de compostos da mesma classe (CHANDA; RAKHOLIYA, 2011). Pesquisas por novos agentes antimicrobianos têm sido estimuladas para combater a resistência bacteriana (OMS, 2014) e a busca por produtos naturais com atividade antibacteriana direta ou combinada com antibióticos de uso clínico podem representar uma nova linha de combate à resistência microbiana (COUTINHO et al., 2008).

Características estruturais ou funcionais inerentes a uma determinada estirpe bacteriana, como ausência de alvo específico em determinados gêneros (ZHU et al., 2010) ou diferenças na composição da membrana (RANDALL et al., 2013), podem determinar a resistência desta estirpe a um antibiótico específico (BLAIR, 2014). Porém, a resistência bacteriana também pode ser adquirida através de mutações gênicas durante um tratamento (HAJIPOUR et al., 2012) ou pela transferência horizontal de genes de resistência através de elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons, bacteriófagos ou ilhas genômicas (FROST et al., 2005; KOONIN; WOLF, 2008). Entre os diversos mecanismos codificados pelos genes de resistência, 3 formas são principais: Redução da concentração do antibiótico no interior da bactéria, modificação de alvos específicos e inativação dos antibióticos por ação enzimática (SILVEIRA et al., 2006).

Através de estudos etnofarmacológicos, é possível catalogar informações a respeito de plantas usadas nas comunidades para tratamento de infecções, e desta forma, terem suas atividades analisadas, com o intuito de isolar novas moléculas com atividade antibacteriana, ou otimizar a ação das mesmas (SILVA et al., 2012). O uso de extratos e óleos essenciais (OE) de plantas também é bastante estudado, que, por possuírem combinações complexas de metabólitos secundários, acabam por dificultar a adaptação bacteriana ao composto (COUTINHO et al., 2009; SIMÕES et al., 2007).

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário das plantas, agindo na proteção das mesmas contra vários agentes agressores (PEREIRA; CARDOSO, 2012; BAKKALI et al., 2008). Têm demonstrado diferentes ações farmacológicas, dentre elas destaca-se a atividade antibacteriana (ARAÚJO et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2007), não só de forma direta, mas como um agente capaz de combater os mecanismos de resistência aos antibióticos, permitindo a ação dos mesmos (CHUNG; NAVARATNAM; CHUNG, 2011).

Quanto à modificação da resistência, o uso de produtos naturais de origem vegetal ou dos seus constituintes químicos isolados, associados com antimicrobianos de uso clínico, pode interferir nos efeitos destes, intensificando ou inibindo o efeito terapêutico. Em outras palavras, podem modular a atividade de antimicrobianos, tendo como resultado um efeito sinérgico ou antagônico, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2006; ALMEIDA et al., 2013). A atuação sinérgica é uma combinação efetiva entre os constituintes presentes em sua composição e o antibiótico. O produto natural, presente na associação com drogas sintéticas, exerce sua atividade ao inibir a resistência microbiana através da eliminação de elementos genéticos móveis e inibição de bombas de efluxo (COUTINHO et al., 2009b; ROCHA, 2012).

Como resultado das interações sinérgicas entre drogas antibacterianas estão uma melhora na eficácia do tratamento clínico, redução da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do agente antibacteriano, redução do risco associado ao desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos e diminuição dos efeitos tóxicos do antibiótico no hospedeiro. Por isso, o uso de substâncias associadas tem sido amplamente estudado e usado como tratamento para infecções (NCUBE et al., 2012; SILVA et al., 2015).

No entanto, o inverso pode acontecer quando ocorre a quelação dos constituintes do antibiótico pelo produto natural testado ou a ligação deste em sítios de ligação dos antibióticos. Quando o efeito do fármaco é reduzido na presença do extrato ou óleo essencial, caracteriza-se a resposta como antagonismo (WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009).

Neste contexto, os metabólitos secundários de origem vegetal, tem se destacado tanto por uma possível atividade antibacteriana direta, quanto por potencializar a atividade antibiótica (TINTINO et al., 2013).

O *Hyptis martiusii* Benth é um arbusto da família Lamiaceae, conhecido popularmente como cidreira-do-mato (COSTA et al., 2005), encontrado em toda Chapada do Araripe, chamando a atenção pelas suas inflorescências brancas em formato de bola e textura macia (ARAÚJO; UCHOA; SILVEIRA, 2003). Por ser fonte de numerosos compostos com amplo espectro de atividades biológicas, tais como propriedade antiviral, antibiótica,

antimalárica, antioxidante e antitumoral (GONZÁLEZ, 2015; ARAÚJO; LIMA; SILVEIRA, 2004; ARAÚJO et al., 2006), o óleo essencial de *Hyptis martiusii* (OEHM) merece atenção especial, devendo ser estudado frente à problemática apresentada.

Estudos sobre o óleo essencial de *Hyptis martiusii* Benth (OEHM) demonstram que sua composição apresenta como compostos majoritários da mistura, um grupo de metabólitos conhecidos como terpenos, sendo estes os prováveis responsáveis pelas suas atividades farmacológicas (ROZZA; PELLIZZON, 2013; COSTA et al., 2005). Os terpenos exercem importante papel na composição dos óleos essenciais, estando associados ao metabolismo secundário das plantas, atuando em vários processos de interação destas com o meio (AHARONI et al., 2006). Fazem parte de uma das duas grandes classes (Fenilpropanoide e terpênica) que compõe os óleos essenciais, sendo sintetizados pela condensação de unidades de difosfato de isopentenila (IDP) e seu isômero difosfato de dimetilalila (DMADP) (HOMEM, 2015). São classificados de acordo com fonte biogenética geral, como produtos antibacterianos naturais (CHUNG; NAVARATNAM; CHUNG, 2011; PATROČKA, 2003).

A utilização dos óleos essenciais na prática clínica torna-se limitada, devido os componentes químicos responsáveis por suas atividades biológicas apresentarem baixo peso molecular e sofrerem volatilização com facilidade. Aliado a isso, tais componentes também apresentam baixa solubilidade e curta meia-vida, bem como rápida oxidação ou hidrólise (SIQUEIRA-LIMA et al., 2014; MENEZES, 2015).

A formação de complexos de inclusão (CI) diminui os processos limitantes acima citados, bem como aumenta biodisponibilidade dos componentes químicos associados a eles “*in vivo*”. Neste sentido, a complexação de substâncias apolares/hidrofóbicas em ciclodextrinas tem sido utilizada cada vez mais pela indústria farmacêutica, para melhoramento dos perfis físico-químicos e, conseqüentemente, farmacológicos dos compostos complexados (LIMA et al., 2016a; BRITO et al., 2015). As ligações formadas entre o complexado e a substância complexante são reversíveis e não-covalentes, sendo esta, uma das características responsáveis pelo melhoramento das atividades farmacológicas no complexo (JAGDALE et al., 2012; AGUIAR, 2013).

Dentre as CD, a β -ciclodextrina (β -CD) é a mais utilizada pela indústria farmacêutica. Ela promove o encapsulamento de substâncias, através da ligação destas com a cavidade interna da β -CD, que é hidrofóbica, formando um complexo do OE/ β -CD (microcápsula), proporcionando proteção para os compostos encapsulados (MATOS-CHAMORRO et al., 2010), liberando o óleo essencial de maneira contínua e gradual, à medida que as ligações em sua cavidade interna ficam enfraquecidas devido as pontes de

hidrogênio formadas na sua superfície externa (SZENTE; SZEJTLI, 2003). A liberação controlada de um antibiótico durante um tratamento é uma importante estratégia para o combate da resistência bacteriana por reduzir a concentração do medicamento necessária ao tratamento, bem como o número de aplicações necessárias para debelar a infecção (RAJEWSKI; STELLA, 1996).

Diante do exposto, este estudo consistiu em avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Hyptis martiusii* Benth em comparação com sua forma complexada em ciclodextrina, determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) tanto em suas atividades antibacterianas diretas, como no seu efeito modulatório em antibióticos padrões, na tentativa de suprir a necessidade de novos agentes antimicrobianos.

2 OBJETIVOS:

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de *Hyptis martiusii* Benth e de seu complexo de inclusão em β -Ciclodextrina.

2.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar a atividade antibacteriana direta do Óleo Essencial de *Hyptis martiusii*, em sua forma simples, contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* padrões e multirresistentes, bem como a atividade modificadora da ação antibiótica do mesmo, associado com Norfloxacin, Gentamicina e Imipenem, contra as cepas resistentes;
- Avaliar a atividade antibacteriana direta do Óleo Essencial de *Hyptis martiusii*, em sua forma complexada em β -CD, contra cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* padrões e multirresistentes, bem como a atividade modificadora da ação antibiótica do mesmo, associado com Norfloxacin, Gentamicina e Imipenem, contra as cepas resistentes;
- Avaliar a atividade antibacteriana direta da β -CD contra cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* padrões e multirresistentes, bem como a atividade modificadora da ação antibiótica da mesma, associada com Norfloxacin, Gentamicina e Imipenem, contra as cepas resistentes;

3 REVISÃO DE LITERATURA:

3.1 Família Lamiaceae

A família Lamiaceae abrange 7.886 espécies catalogadas, contidas em 245 gêneros de plantas (THE PLANT LIST, 2013). As plantas da família Lamiaceae são amplamente utilizadas na culinária, decoração e na criação de abelhas. Uma característica marcante nas plantas desta família é a presença de pelos glandulares em órgãos vegetativos e reprodutivos, dos quais são extraídos óleos essenciais (WERKER, 2006; HANLIDOU et al., 1991). Nesta família, a estrutura do pecíolo é determinante na taxonomia, sendo essencial na diferenciação entre gêneros e espécies (OLOWOKUDEJO, 1987; AKÇIN et al., 2011). O pericarpo dos frutos da família Lamiaceae, também apresenta diferenças capazes de resolver problemas taxonômicos quanto a níveis genéricos, específicos ou mesmo infra-específicos (HUSSEIN, 2000).

Desde a antiguidade, suas plantas aromáticas são utilizadas na medicina tradicional. Nos óleos essenciais, extraídos de suas folhas e caules, há presença de grande quantidade de monoterpenos, tais como mentol e timol (ANTIKOLINESTERAZ; BITKILERI, 2014). Além dos monoterpenos, as plantas desta família são ricas em sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e flavonoides (ULUBELEN; TOPÇU; KOLAK, 2005). As atividades biológicas dos óleos das diversas espécies desta família variam de efeitos antimicrobianos a neuroproteção (PERRY; HOWES, 2011).

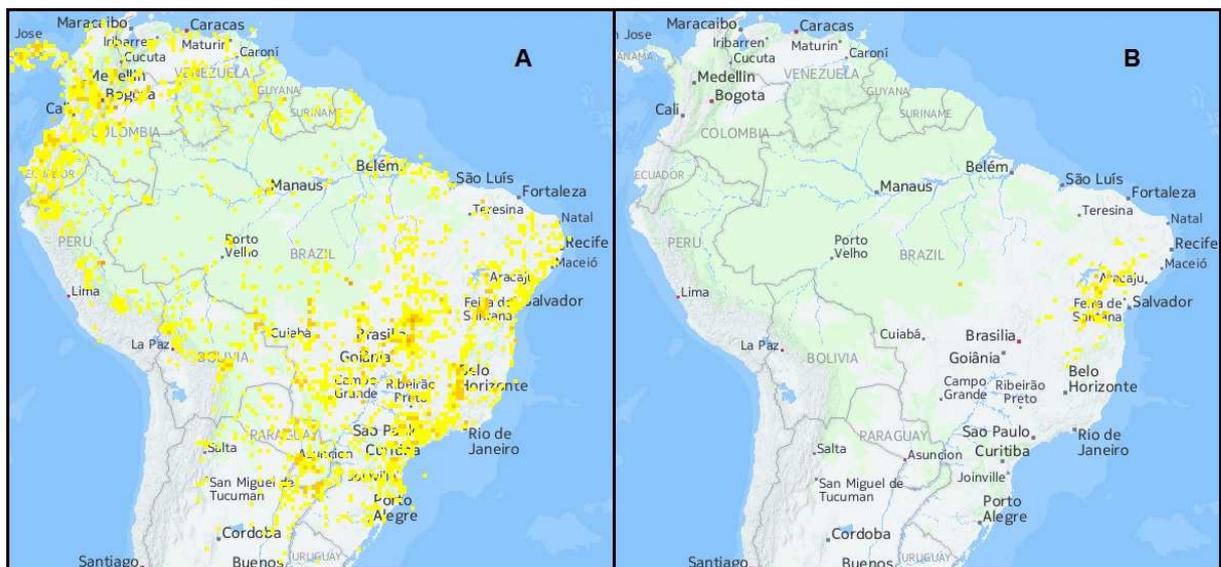
3.1.1 Gênero *Hyptis*

O gênero *Hyptis* apresenta 417 espécies catalogadas (GBIF, 2016), são amplamente difundidas pela América tropical, desde América do Norte ao sul da América do Sul (CALDAS et al., 2013), tendo como “*habitat*” principalmente locais abertos e úmidos, tais como orla de matas de galeria e margens de cursos d’água (KROEFF et al., 2002). A dispersão das plantas deste gênero no Brasil está demonstrada na Figura 1.

São utilizadas das mais diversas formas como produtos medicinais, já tendo sido demonstrada importantes atividades biológicas de seus óleos essenciais e/ou constituintes, desde repelentes contra mosquitos à agentes antimicrobianos (ARAÚJO et al., 2003; CALDAS et al., 2013; KOTHANDAN; SWAMINATHAN, 2014; TANG et al., 2014). Plantas do gênero *Hyptis* possuem uma notável variabilidade química. Entre os compostos químicos

resultantes de seu metabolismo secundário estão os flavonoides, lactonas, lignanas, derivados fenólicos, ácidos graxos e terpenos (monoterpenos, triterpenos, diterpenos e sesquiterpenos) (RAMOS, 2015; MEDRADO et al., 2015; BRANQUINHO, 2015; COUTINHO et al., 2008b; CALDAS et al., 2013), sendo estes últimos, os componentes centrais dos óleos essenciais das diversas espécies deste gênero (CALDAS et al., 2013).

Figura 1: Distribuição do Gênero *Hyptis* Jacq. (A) e da espécie *Hyptis martiusii* Benth. (B) no Brasil.



Fonte: (GBIF – Global Biodiversity Information Facility, 2016). Os pontos amarelos indicam a presença de plantas do gênero *Hyptis* em “A” e da espécie *Hyptis martiusii* em “B”.

As diversas espécies que compõem este gênero são bastante utilizadas na medicina popular contra doenças gastrointestinais (COSTA-LOTUFO et al., 2004) e atividades antiulcerogênica (PINHEIRO et al., 2015), antisséptica (SHENOY; PATIL; KUMAR, 2009), antibacteriana (SANTOS et al., 2015), antifúngica (MOREIRA et al., 2010) e antinociceptiva (ANJOS et al., 2017) já foram descritas na literatura.

Em estudos recentes, óleos essenciais, extratos ou substâncias isoladas de plantas do gênero *Hyptis* apresentaram diversos efeitos significativos. Mueller e colaboradores (2017) relatou efeitos prebióticos de oligossacarídeos presentes em *H. suaveolens*; fração de acetato de etila de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. produziu efeitos antinociceptivos nos testes de capsaicina e glutamato em ratos (FALCÃO et al., 2016); diterpenos isolados das raízes de *Hyptis carvalhoi* Harley mostrou efeito citotóxico sobre células de adenocarcinomas, induzindo as células à autofagia e apoptose (ARAÚJO et al., 2013); Ivoke, Okafor e Owoicho (2009) demonstraram que os extratos aquosos e etanólicos de *H. suaveolens* possuem atividade ovicida e larvicida contra *Anopheles gambiae*; extratos etanólicos de *Hyptis*

spicigera possui potente efeito antimalárico (URAKU et al., 2015) e efeito antioxidante em camundongos expostos ao *Plasmodium berghei* (AJA et al., 2015); o óleo essencial de *Hyptis pectinata* possui efeitos analgésicos em protocolo de dor induzido por formalina em ratos (MENEZES et al., 2015); óleo essencial de *Hyptis atrorubens* Poit. apresentou atividades antibacterianas e antifúngicas contra *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* (KERDUDO et al., 2016); o Óleo essencial de *Hyptis leucocephala* Mart ex Benth apresentou atividade antibacteriana significativa contra *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli* (SANTOS et al., 2015); e o óleo essencial de *Hyptis colombiana* apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (FLORES et al., 2015).

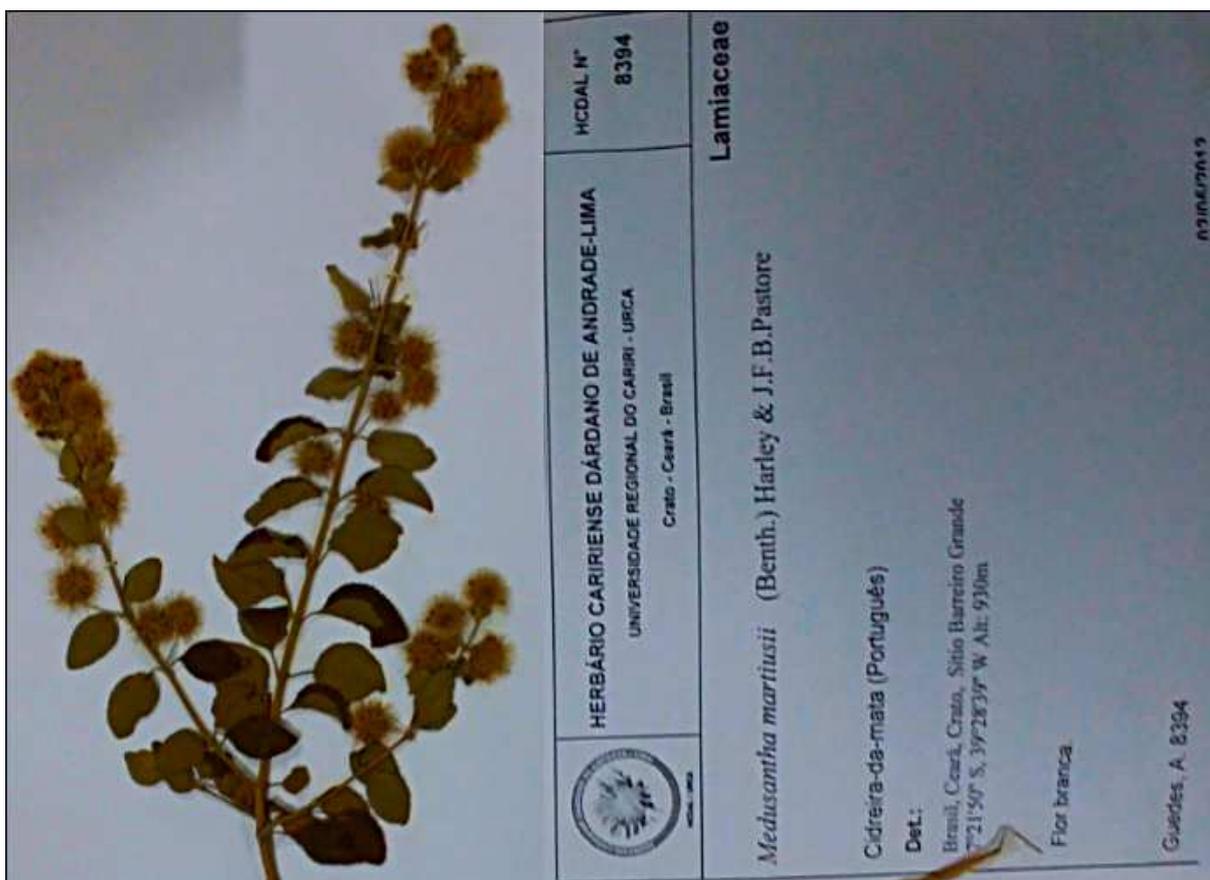
3.1.2 *Hyptis martiusii* Benth

3.1.2.1 A espécie

O *Hyptis martiusii* Benth é um arbusto ereto e ramificado, com altura compreendida entre 1,6 e 2,3 m, apresenta flores brancas de textura delicada, reunidas em inflorescências globulosas terminais (SILVEIRA; PESSOA, 2005). Folhas e inflorescência desta espécie podem ser visualizadas na Figura 2. É popularmente conhecido como cidreira-do-mato, cidreira-brava ou cidreira-do-campo (CALDAS et al., 2013; ROZZA; PELLIZZON, 2013; ARAÚJO; LIMA; SILVEIRA, 2004).

É encontrado nas regiões tropicais e subtropicais do globo (COSTA-LOTUFO et al., 2004). No Brasil, sua ocorrência se dá de Norte até Sudeste, crescendo abundantemente no Nordeste, onde se encontra largamente disseminado no sul do Ceará e no estado do Pernambuco (CALDAS, 2013), como demonstrado na Figura 1. No Ceará, o *Hyptis martiusii* é encontrado na chapada do Araripe, e em Pernambuco, sua ocorrência se estende da Zona da Mata à Caatinga (ALMEIDA; ALBUQUERQUE, 2002; CALDAS et al., 2013).

Figura 2: Exsicata de *Hyptis martiusii* Benth. Inflorescência e Folhas.



Fonte: Herbario Cariense Dárdano de Andrade lima.

3.1.2.2 Composição Química

Diversos estudos sobre a composição do óleo essencial de *Hyptis martiusii* foram realizados, a fim de relacionar a composição da espécie em estudo com o gênero, bem como com suas atividades farmacológicas. Araújo et al. (2003) analisou a constituição do OEHM provenientes das folhas e das inflorescências. No óleo essencial das folhas foram identificado 26 constituintes, representando 93,2% do total. No óleo essencial da inflorescência foram identificado 27 constituintes representando 87,7% do total. A diferença entre as composições deu-se pela presença dos compostos terpenoides e monoterpênicos, ambos com concentrações mais baixas no óleo da inflorescência. No óleo das folhas, os componentes majoritários foram 1,8-cineol (24,3%) e δ -careno (22,5%), bicyclogermacreno (6,3%) e β -cariofileno (6,1%). No óleo da inflorescência, os componentes majoritários foram δ -careno (13,5%), viridifloreno (8,25%), β -cariofileno (6,59%) e o α -pineno (5,78%).

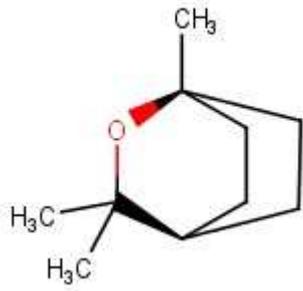
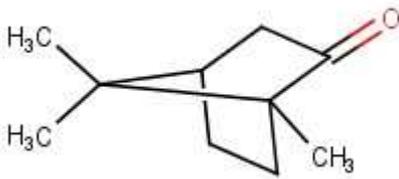
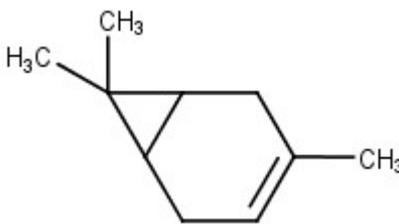
Em estudo posterior, Caldas et al. (2013) fez a análise química do óleo essencial de *Hyptis martiusii* identificando como componentes majoritários o 1,8-cineol (32,80%), δ -3-

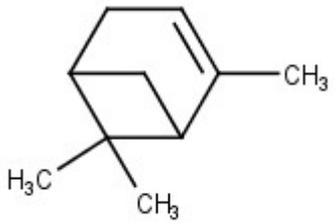
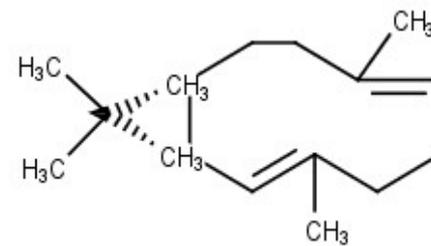
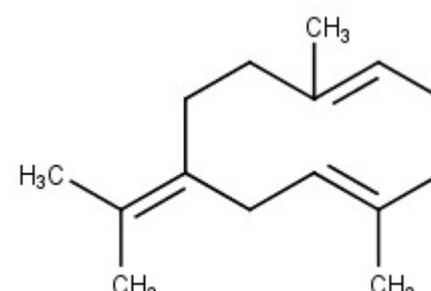
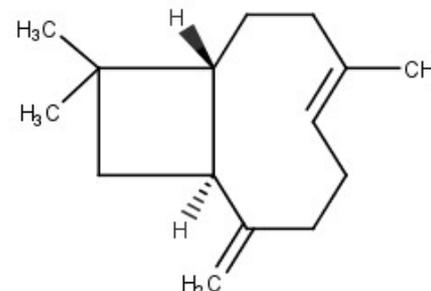
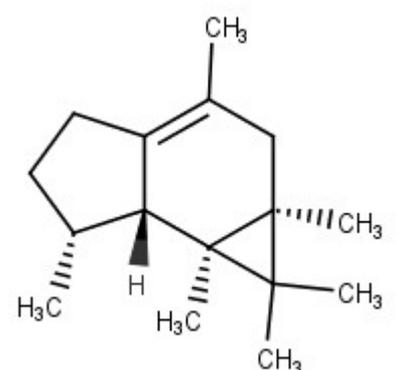
Careno (17.43%), cânfora (6.70%), α -pineno (3.52%) e o Óxido de Cariofileno (3.50%).

Já em estudo de Barbosa et al. (2017), na caracterização fitoquímica do óleo essencial de folhas de *H. martiusii* foi identificado 18 constituintes, responsáveis por 87,63% do total. Foi demonstrada a presença de compostos mono e sesquiterpenos, sendo os componentes majoritários representados pelo 1,8-cineol (34,58%), δ -careno (21,58%), cânfora (5,17%), limoneno (4,94%) e germacreno B (3,39%).

As variações na composição dos Óleos essenciais, mesmo de uma mesma planta, podem ser dependente de vários fatores, dentre estes, as condições climáticas e de solo, localização geográfica, ciclo vegetativo da espécie, a época de coleta, bem como o órgão específico (parte da planta) do qual foi extraído (DORMAN; DEANS, 2000; CALDAS et al., 2013). Os principais compostos presentes no OEHM estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1: Principais constituintes químicos do óleo essencial de *Hyptis martiusii*.

Nome do Composto	Fórmula Estrutural	Fórmula Química	Classe do Composto
1,8-Cineol		$C_{10}H_{18}O$	Monoterpenoide
Cânfora		$C_{10}H_{16}O$	Monoterpenoide
δ -careno		$C_{10}H_{16}$	Monoterpeno

<p>α-Pino</p>		<p>$C_{10}H_{16}$</p>	<p>Monoterpeno</p>
<p>Biclogermacreno</p>		<p>$C_{15}H_{24}$</p>	<p>Sesquiterpeno</p>
<p>Germacreno B</p>		<p>$C_{15}H_{24}$</p>	<p>Sesquiterpeno</p>
<p>β-Cariofileno</p>		<p>$C_{15}H_{24}$</p>	<p>Sesquiterpeno</p>
<p>Viridiflore</p>		<p>$C_{15}H_{24}$</p>	<p>Sesquiterpeno</p>

Fonte: Autor. Todas as estruturas químicas foram produzidas com o programa MarvinSketch 17.13.

3.1.2.3 Atividades Farmacológicas

O óleo essencial da espécie *Hyptis martiusii* é rico em terpenos (mono e sesquiterpenos), sendo seus principais constituintes (BARBOSA et al., 2017). Porém, sendo uma mistura complexa de compostos, suas propriedades farmacológicas são, provavelmente, um efeito sinérgico dos vários produtos que compõe a mistura (CALDAS et al., 2014).

Fazendo uma busca com a palavra “*Hyptis martiusii*” na base de dados do PUBMED e da Biblioteca Virtual em Saúde, no período entre outubro de 2015 a março de 2017, com posterior refinamento para busca da palavra no título do artigo, foram encontrados 18 e 20 artigos respectivamente, retratando a espécie seja em forma de extrato, óleo ou compostos isolados. A mesma forma de busca e refinamento foi feita no Google Acadêmico, sendo encontrados 24 artigos. Após verificação de títulos, autores e anos, foram catalogados 24 artigos diferentes, dos quais, 6 retratavam o efeito antibacteriano da espécie e os demais abordavam outras bioatividades da espécie.

De acordo com estes estudos, *H. martiusii* possui propriedades antimitóticas (COSTA-LOTUFO et al., 2004), larvicida (ARAÚJO et al., 2003), anti-epimastigota (SANTOS et al., 2013), anti-edematogênica (BARBOSA et al., 2017), gastroprotetor (CALDAS et al., 2011; CALDAS et al., 2014), antioxidante (SANTOS, 2010), antibacteriano (COUTINHO et al., 2008b; COUTINHO et al., 2009d; COUTINHO et al., 2009c; COUTINHO et al., 2010a; COUTINHO et al., 2010b; OLIVEIRA et al., 2014) e antifúngica (OLIVEIRA et al., 2014, SANTOS et al., 2013), além de apresentar baixa toxicidade (CALDAS et al., 2011; CALDAS et al., 2013).

Segundo Costa-Lotufô et al. (2004), compostos diterpenos isolados do OEHM, produzido a partir de partes aéreas, possuem uma fraca atividade antimitótica “*in vitro*”, mas a possibilidade de obter compostos derivados com maiores efeitos torna o estudo interessante.

O OEHM extraído das folhas do arbusto apresentou efeito larvicida contra larvas do *Aedes aegypti*, sendo tal efeito atribuído à presença do 1,8-cineol como componente majoritário do óleo das folhas (ARAÚJO et al., 2003).

Resultados obtidos por Santos et al. (2013) apontam o extrato etanólico obtido a partir de folhas de *H. martiusii* como provável fonte de recursos contra tripanossomas e fungos, seja de forma isolado ou combinado com drogas já em uso.

A atividade anti-edematogênica do OEHM, extraído de folhas, foi estudada por Barbosa et al. (2017). Nesse estudo o OEHM não teve uma atividade anti-edematogênica tópica significativa, porém apresentou atividade sistêmica no modelo de edema da pata, sendo

seus efeitos relacionados a presença dos constituintes majoritários 1,8-cineol, d-careno, cânfora e limoneno.

Estudo realizado por Caldas et al. (2011) demonstrou que o OEHM, extraído de folhas, possui efeitos gastroprotetores dose-dependentes. Tal efeito gastroprotetor sobre a mucosa gástrica tem como mecanismo de ação, propriedades antissecretoras, citoprotetoras e antioxidantes do OEHM (CALDAS et al., 2014). O mecanismo antioxidante do Óleo essencial foi estudado por Santos et al. (2010), que descreveu a atividade antioxidante, decorrente da presença de compostos fenólicos como taninos e flavonoides.

Quanto as propriedades antibacterianas, o Extrato Etanólico obtido das partes aéreas de *H. martiusii* (EEHM) foi testado por Coutinho et al. (2008b) quanto à sua propriedade anti-estafilocócica direta, demonstrando ser este, de 2 a 4 vezes mais eficaz do que o aminoglicosídeo gentamicina contra espécies resistentes à metilicina. Estudos posteriores confirmaram esse efeito antibacteriano, seja isoladamente (direto) ou modulando a atividade antibacteriana de antibióticos padrões. O EEHM, extraído a partir das folhas da planta, modulou sinergicamente 5 aminoglicosídeos (Amicacina, Gentamicina, Kanamicina, Neomicina e Tobramicina) podendo servir como fonte de compostos com propriedade de modificar a atividade antibiótica e combater a multirresistência bacteriana (COUTINHO et al., 2009d).

O EEHM, extraído a partir das partes aéreas, apresentou um efeito aditivo contra cepa resistente de *Escherichia coli* quando associado aos aminoglicosídeos Neomicina, Gentamicina, Amicacina e Canamicina (COUTINHO et al., 2010b). Em trabalho realizado por Coutinho et al. (2010a) foi demonstrado que a combinação do extrato com antibióticos, ocasionou a redução da CIM para 3 aminoglicosídeos (Gentamicina, Canamicina e Neomicina) contra cepa de *Staphylococcus aureus* resistente, sugerindo um mecanismo de atuação que envolvia inibição de bombas de efluxo sensíveis e insensíveis à Clorpromazina. O EEHM (extraído das partes aéreas) também demonstrou aumento da atividade antibacteriana, após exposição à luz UV-A, apresentando fototoxicidade contra cepas de *S. aureus* e *E. coli* (COUTINHO et al., 2009c).

De acordo com Oliveira et al. (2014), O óleo essencial extraído de folhas do *Hyptis martiusii* apresentou atividade antibacteriana para as cepas padrão e resistentes de *Escherichia coli* (EC ATCC 2592 e EC 27), *Bacillus cereus* (BC ATCC 33018), *Pseudomonas aeruginosa* (PA ATCC 15442) e *Staphylococcus aureus* (SA ATCC 1269).

Quanto ao efeito antifúngico, em estudo realizado por Santos et al. (2013), o EEHM (extraído de folhas) apresentou atividade antifúngica direta contra cepas de *Candida krusei*, e

atividade modificadora da ação antifúngica do metronidazol, quando testado contra cepas de *Candida tropicalis*, atuando sinergicamente, reduzindo o valor da CIM em 4 vezes.

Em estudo sobre a toxicidade, o óleo essencial de *Hyptis martiusii*, extraído a partir de folhas, não mostrou sinais visíveis de toxicidade, tais como diarreia, sedação, alterações na atividade locomotora ou morte nos animais tratados, durante 14 dias de observação (CALDAS et al., 2011; CALDAS et al., 2013). Porém, uma análise hematológica revelou um significativo aumento da concentração de albumina em fêmeas de ratos quando comparadas ao controle (CALDAS et al., 2013).

3.2 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são compostos pelos metabólitos secundários das plantas. Antes pensados como produto de excreção do vegetal, tais metabólitos são respostas dos vegetais aos estímulos do meio (PEREIRA; CARDOSO, 2012), que podem conter mais de sessenta compostos diferentes nas mais variadas concentrações. Agem na proteção das plantas contra pragas variadas, desde as formas microscópicas até os grandes herbívoros, bem como são atrativos de animais que favorecem a reprodução e dispersão das mesmas (BAKKALI et al., 2008).

Podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta, da raiz às folhas. Devido ao baixo peso molecular dos seus componentes, se mostram como líquidos voláteis geralmente incolores, lipossolúveis. Possuem 2 ou 3 componentes que se apresentam com concentrações maiores que os demais. Estes são os componentes majoritários, que geralmente, determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008).

Plantas e seus metabólitos secundários são uma fonte potencialmente promissora para fornecer compostos bioativos terapeuticamente importantes, incluindo antimicrobianos (FUMAGALI et al., 2008). Tais metabólitos compõem um grupo de compostos de interesse crescente para pesquisadores contra a resistência bacteriana aos fármacos. (CHANDA; DUDHATRA; KANERIA, 2010).

O efeito antibacteriano dos óleos essenciais pode ocorrer de forma direta sobre o patógeno, atuando através da inibição dos mecanismos que determinam sua virulência, ou de forma indireta, potencializando a atividade do antibiótico através da quebra dos mecanismos de resistência bacteriana (GONZÁLEZ-LAMOTHE et al., 2009). Por apresentarem diversos componentes metabólitos, cada um apresentando um determinado mecanismo de ação contra as bactérias, o risco para o desenvolvimento da resistência microbiana é reduzido com o seu uso associado (AMARAL, 2004; DAFERERA et al., 2003).

Dentre os vários componentes dos óleos essenciais, os compostos terpenoides são os mais relacionados à sua atividade bacteriostática e/ou bactericida (BURT, 2004).

3.2.1 Terpenos

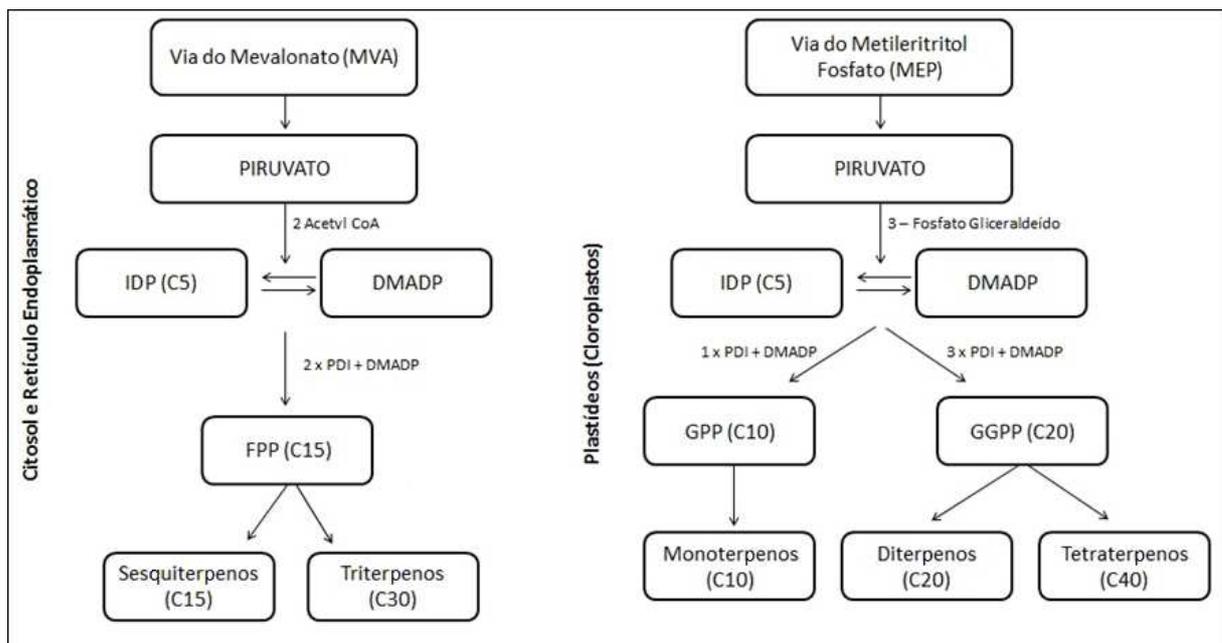
Terpenos são compostos de hidrocarbonetos (formados por carbono e hidrogênio) que consistem de múltiplas unidades de isopreno e podem ou não serem cíclicos (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995). Constituem o maior grupo de metabólitos secundários e

quando possuem elementos adicionais em sua estrutura, como o oxigênio, são denominados terpenoides. Estes são os principais constituintes ativos de plantas, estando descritas mais de 30.000 substâncias (MAIA, 2006).

Os terpenos têm sido utilizados por diferentes civilizações há mais de dois mil anos. Relatos de seu uso foram descritos no Egito entre 400 e 700 anos depois de Cristo, com a utilização do ácido boswellico (TURNER, 1969), porém, a análise química dos terpenos só veio a ocorrer no início do século XIX, identificando constituintes para uso em aromaterapia (LELAND et al, 2006). Atualmente, os Terpenos são usados pela bioengenharia no processo de melhoramento genético de várias plantas, aumentando a resistência às pragas e até mesmo aumento da polinização (AHARONI et al., 2006). Nos últimos anos, as tentativas de bioengenharia foram bem sucedidas, criando plantas transgênicas capazes de superexpressar genes tradutores de monoterpenos (AHARONI et al., 2003).

A síntese dos terpenos ocorre pela condensação de unidades de difosfato de isopentenilo (IDP) e do seu isômero difosfato de dimetilalilo (DMADP), utilizando o piruvato como molécula precursora, através de duas vias biossintéticas: via do mevalonato (MVA) e a via do metileritritol fosfato (MEP), conforme esquema apresentado na Figura 3. A adição de unidades sequenciais de IDP e do seu isômero produzem compostos com quantidades variadas de carbono: Monoterpenos (C10), Sesquiterpenos (C15), Triterpenos (C30), Diterpenos (C20) e Tetraterpenos (C40) (AHARONI et al., 2006).

Figura 3: Vias biossintéticas dos terpenos.



Fonte: Aharoni et al. (2006), adaptado.

3.2.1.1 Monoterpenos

Esta variedade de terpenos é composta pela combinação de duas moléculas de isopreno, formando um composto de dez átomos de carbono, em formas acíclicas e cíclicas aromáticas. Possuem variados arranjos na natureza e constituem o principal componente de muitos óleos essenciais. Os monoterpenos provêm de fontes comuns, plantas que frequentemente usamos no nosso dia-a-dia, como folhas de louro, erva-cidreira, hortelã, coentro e eucalipto (LELAND et al., 2006).

Apresentam propriedades antimicrobianas associadas à características lipofílicas. Deslocam-se da fase aquosa à membrana celular, na qual exercem seus efeitos sobre estrutura e função da mesma, desordenando as proteínas membranares, inibindo a respiração e alterando o processo de transporte de íons, o que danifica a função de barreira seletiva e compromete a geração de energia celular, tendo como efeito final, lise celular (VALERIANO et al., 2012).

Dentre os Monoterpenos, o mentol é um importante componente de extratos aromáticos e óleos essenciais, contribuindo de forma substancial para o potencial antimicrobiano dos mesmos, sendo seu efeito já demonstrado na literatura (MATOS et al., 2009; ALVES et al., 2010). Já o α -pineno é citotóxico, lipofílico, bactericida e fungicida (OLIVEIRA et al., 2016).

3.2.1.2 Sesquiterpenos

Compostos por 15 átomos de carbono, são formados pelo encadeamento de três unidades de isopreno, existindo sob arranjos de cadeias abertas ou fechadas. Nos óleos essenciais dos quais são extraídos, geralmente se apresentam como compostos majoritários (LELAND et al, 2006).

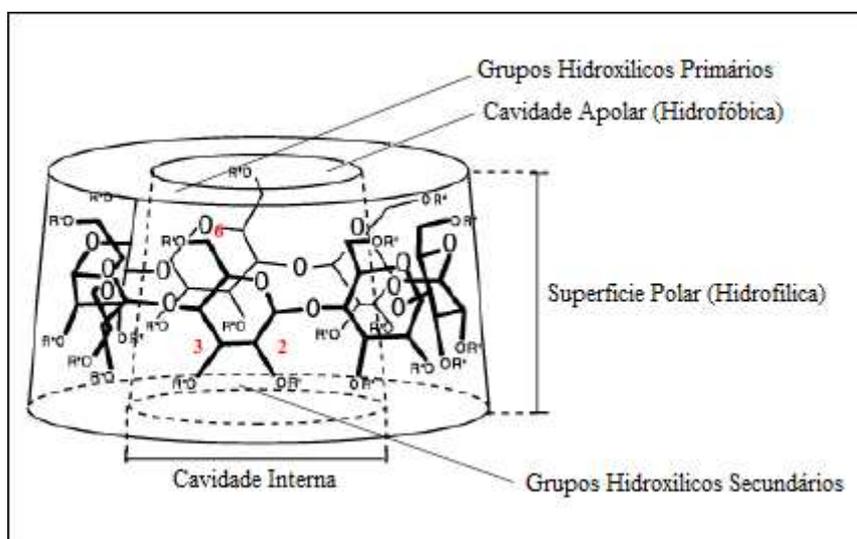
O cariofileno (sesquiterpeno presente no OEHM) apresenta atividade antiepimastigota já demonstrada na literatura contra os parasitas *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania brasiliensi*, sendo capaz de eliminar 100 % da amostra do *L. brasiliensis* (LEITE et al., 2013), como também apresenta atividade antidepressiva, agindo sobre os α_2 e β -adrenoceptores (OLIVEIRA, 2016).

3.3 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, que apresentam estrutura tridimensional em forma de cone. São formadas por unidades de glucopiranosose ligadas por ligações α -1,4-glicosídicas, de forma que os grupos hidroxilas (OH) presentes na molécula se dividem em primários (ligadas ao carbono C-6) e secundários (ligadas aos carbonos C-2 e C-3) (CHEPULIS; FRANCIS, 2012; FAHNING; LOBÃO, 2011). A estrutura tridimensional das ciclodextrinas está esquematizada na Figura 4.

O bordo mais estreito da estrutura cônica é formado pelos grupos hidroxilas primários e os grupos secundários se estendem por todo o bordo mais largo, formando uma cavidade central lipofílica e uma superfície exterior hidrofílica (LIMA et al., 2016a; ARUN; ASHOK; SRAVANTHI, 2008), permitindo o encaixe (ligação) de moléculas hidrofóbicas (convidado) no seu interior, constituindo uma verdadeira complexação molecular (LIMA et al., 2016a). O caráter hidrofóbico da cavidade das CDs ocorre devido a presença de átomos de oxigênio nas ligações glicosídicas (em C-1 e C-4) e dos átomos de hidrogênio ligados em C-3 e C-5 (FAHNING; LOBÃO, 2011).

Figura 4: Estrutura tridimensional das Ciclodextrinas.



Fonte: Adaptado de Guedes et al. (2008).

Descobertas por Villiers no final do século XIX, a partir da degradação do amido, as CDs foram caracterizadas por Franz Schardinger quanto a sua preparação apenas em 1938. Nas duas décadas que se seguiram, as ciclodextrinas tiveram sua estrutura e propriedades físico-químicas estudadas e entre o período de 1935 e 1955, sua capacidade de formar

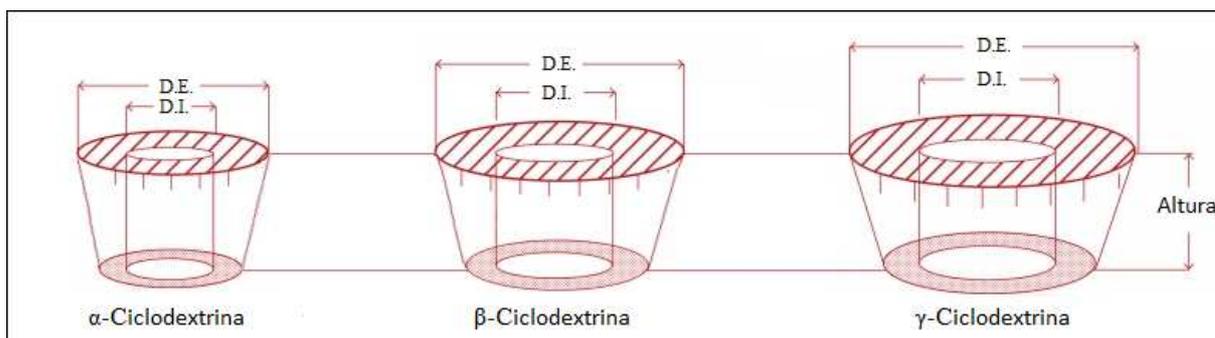
complexos de inclusão, foi verificada por Freudenberg, French, Cramer e colaboradores (UEKAMA; HIRAYAMA; IRIE, 1998; CHIERENTIN, 2013; FAHNING; LOBÃO, 2011).

São produzidas a partir da degradação enzimática do amido (CHEPULIS e FRANCIS, 2012), por ação da enzima [1,4-alfa-glucano 4-alfa-D-(1,4-alfa-D-glucano)-transferase] (CHIERENTIN, 2013), mais conhecida por ciclodextrina glucanotransferase (CGTase), obtida de vários microrganismos como *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus* e *Klebsiella pneumonia*, porém o principal microrganismo responsável pela síntese de ciclodextrina glucanotransferase é o *Bacillus macerans*. Essa enzima tem a capacidade de transformar a cadeia linear de amido em moléculas cíclicas (DRUNKLER; FETT; LUIZ, 1999; WHISTLER; BEMILLER; PASCHALL, 1984).

A partir da ação enzimática da CGTase, são produzidas moléculas com 6,7 ou 8 unidades de D(+) glicopiranoose (CHIERENTIN, 2013), nomeadas de acordo com a quantidade destas unidades na molécula final com uma letra grega diferente: α -ciclodextrina (6 moléculas de D(+) glicopiranoose), β -ciclodextrina (7 unidades), γ -ciclodextrina (8 unidades) (SZENTE; SZEJTLI, 2003; MATOS-CHAMORRO et al., 2010).

3.3.1 Classificação das ciclodextrinas

As Ciclodextrinas classificam-se em naturais e derivadas (GIDWANI; VYAS, 2014). As naturais são aquelas não submetidas a processos industriais de troca de radicais na sua estrutura, sendo obtidas pela ação direta de diversos microrganismos sobre o amido (α -CD, β -CD e γ -CD), enquanto as derivadas, geralmente sofrem reações de substituição nas hidroxilas primárias ou secundárias (BOLDRINI, 2005; PINHO et al., 2013). De acordo com o radical inserido na sua estrutura, as CDs derivadas classificam-se em hidroxialquiladas, iônicas, ramificadas e poliméricas (BOLDRINI, 2005). As estruturas das ciclodextrinas naturais estão representadas na Figura 5 e suas propriedades físico-químicas no Quadro 2.

Figura 5: Conformação das Ciclodextrinas naturais.

Fonte: Adaptado de Gidwani e Vyas (2014). D.I.: diâmetro interno; D.E.: diâmetro externo.

Ao observarmos o desenho, podemos perceber que a altura da estrutura cônica das ciclodextrinas naturais é a mesma, porém, o volume e o diâmetro da cavidade interna variam de acordo com a quantidade de moléculas de glicopiranoose. O volume e o diâmetro das CDs são características determinantes sobre quais moléculas possuem o melhor encaixe na cavidades (PINHO et al., 2013).

Quadro 2: Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas naturais.

CD	Nº	P.M. (g/mol)	D.I. (Å)	D.E. (Å)	Altura (Å)	V.C. (nm ³)	S.A. 25° (%m/v)
α-CD	6	972	4,7 – 5,3	13,7	7,9 ± 0,1	17,4	14,5
β-CD	7	1135	6,0 – 6,5	15,3	7,9 ± 0,1	26,2	1,85
γ-CD	8	1297	7,5 – 8,3	16,9	7,9 ± 0,1	42,7	23,2

Fonte: Quadro retirado de (Fahning e Lobão, 2011). Nº: Número de Unidades de Glicopiranoose; PM: Peso Molecular; D.I.: Diâmetro Interno da cavidade; D.E.: Diâmetro Externo da cavidade; V.C.: Volume da Cavidade; S.A.: Solubilidade Aquosa.

A β-Ciclodextrina, também conhecida como β-dextrina de Schardinger, Ciclomaltoheptose, cicloheptaglucano ou cicloheptaamilose, é mais utilizada na indústria farmacêutica, devido a disponibilidade e baixo custo (CHIERENTIN, 2013), além de sua cavidade ser capaz de interagir com a maioria das moléculas de interesse (massa molecular entre 100 e 400 g/mol) (AGUIAR et al., 2014).

3.3.2 Formação do Complexo

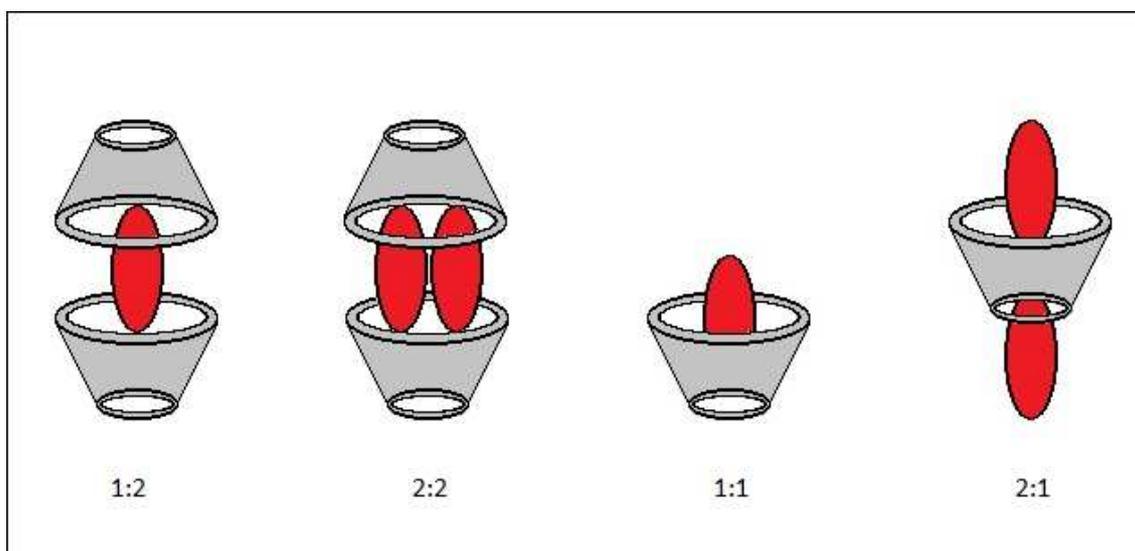
A conformação espacial das ciclodextrinas é uma característica essencial para a formação de Complexos de Inclusão (CI), com o encaixe de uma molécula apolar (lipofílica) na sua cavidade central hidrofóbica, podendo a CD envolver todo o hóspede no interior de sua

cavidade ou apenas uma porção (GUERRERO, 2006; PINHO et al., 2013). Esse referido processo de complexação molecular entre "hóspede" e CD não envolve ligações covalentes. Por serem forças intermoleculares, as ligações envolvidas na formação do complexo de inclusão são dependentes do ajuste da molécula na cavidade hidrofóbica (CHIERENTIN, 2013).

A formação do complexo ocorre no nível supramolecular, com a substituição de moléculas de águas presentes no interior da CD pelo hóspede lipofílico (MANAKKER et al., 2009). Durante a complexação ocorre uma diminuição da entalpia do sistema devido a substituição de moléculas de água (elevada entalpia) por moléculas hóspedes (menor entalpia), sendo, portanto, um processo energeticamente viável, ocorrendo, por esse motivo, de forma espontânea (LYRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; AGUIAR, 2013).

Para a complexação, é importante haver um ajuste tridimensional entre a CD e a molécula "hóspede", bem como de um equilíbrio entre as forças que atuam na formação do CI (JUG; BEĆIREVIĆ-LACÁN; BEAIREVIA-LAEAN, 2008; MENEZES, 2015). As principais forças intermoleculares são interações hidrofóbicas (GUEDES et al., 2008), modificações na superfície do solvente (MANAKKER et al., 2009), pontes de hidrogênio, interação de Vander Waals e interação de transferência de carga (LIU; GUO, 2002; GUERRERO, 2006; MENEZES, 2015), estabilizando o arranjo dinâmico encontrado nos CI (LYRA et al., 2010). Quatro tipos de estequiometria podem ser formadas entre Hóspede/CD, como demonstrado na Figura 6: 1:2; 2:2; 1:1; 2:1, sendo a 1:1 a mais comum (SONG et al., 2009).

Figura 6: Possíveis Relações estequiométricas entre Hóspede/CD.



Fonte: Adaptado de Chierentin (2013).

As diversas forças atuantes na interação Hóspede/CD são formadas e quebradas constantemente, com meia-vida de formação/dissociação de frações de segundos, significando que os complexos de inclusão estão em contínuo processo de formação e dissociação (STELLA et al., 1999; GUEDES et al., 2008; SALUSTIO et al., 2011).

A complexação não é uma simples mistura, as propriedades físico-químicas do complexo formado não são as mesmas das substâncias que reagiram para a sua formação. A solubilidade, reatividade química, absorção UV, retenção de drogas, estabilidade química, e permeabilidade através de membranas estão entre as propriedades físico-químicas afetadas (DRUNKLER; FETT; LUIZ, 1999; HIROSE, 2001; CHIERENTIN, 2013).

Devido suas características estruturais, os complexos de inclusão melhoram a solubilidade das moléculas hóspedes e as protegem de condições danosas como temperatura, pH, oxidação e luz, podendo aumentar a vida útil do fármaco e reduzir a concentração da substância necessária para produzir um determinado efeito esperado (DRUNKLER; FETT; LUIZ, 1999; JAGDALE et al., 2012; PINHO et al., 2013), reduzindo os efeitos colaterais, tais como irritações gástrica, dérmica ou ocular, e prevenindo interações medicamentosas (GUEDES et al., 2008; LYRA et al., 2010; LIMA et al., 2016a).

A utilização de complexos Hóspede/CD aumenta a biodisponibilidade do fármaco, com conseqüente aumento de sua concentração na superfície da barreira biológica (CHALLA et al., 2005), permitindo sua passagem por esta barreira (TEIXEIRA, 2008).

Os sistemas de entrega de medicamentos, proporcionados pela complexação de fármacos com ciclodextrinas, permitindo a liberação controlada de fármacos, oferece inúmeras vantagens para diversos tipos de tratamento terapêutico (AGUIAR et al., 2014).

3.3.3 Estudos sobre atividade antibacteriana

As Ciclodextrinas transportam moléculas lipofílicas até as membranas celulares (GUEDES et al., 2008) e o contato direto dos compostos complexados com a membrana celular, aumentam o contato do composto hóspede com a membrana, provavelmente em decorrência de diferenças de cargas (TEIXEIRA, 2008). Porém, devido seu grande peso molecular, em geral, as CDs não atravessam as membranas lipofílicas (ARUN; ASHOK; SRAVANTHI, 2008), penetrando no interior das células apenas a forma livre do fármaco em equilíbrio no complexo, exercendo desta forma seus efeitos biológicos (LOFTSSON et al., 2003).

A liberação/retenção do composto hóspede pela CD varia de acordo com várias características do composto complexado, a saber: peso da molécula, forma, função química, polaridade e volatilidade, e por isso, os efeitos dos fármacos podem ou não serem melhorados com a utilização das CD (GUERRERO, 2006).

Resultados diversos são encontrados na literatura, indicando resultados positivos e negativos quanto à atividade antibacteriana, dependendo do composto complexado.

Estudos de Matos-Chamorro et al. (2010) e Guerrero (2006) apontam ausência de efeito antimicrobiano do óleo essencial de orégano e do óleo essencial de canela, respectivamente, quando complexados com β -ciclodextrina.

Compostos fenólicos complexados com β -ciclodextrina tiveram sua atividade antibacteriana diminuída contra cepas Gram-positivas, quando comparados aos controles, devido a uma possível redução da interação dos compostos fenólicos com a membrana bacteriana (PINHO; SOARES; HENRIQUES, 2015).

Por outro lado, estudo sobre a atividade de clorexidina complexada com β -Ciclodextrina em bactérias periodonticas demonstrou uma CIM menor do que clorexidina isoladamente (CORTES et al., 2001; GALICE et al., 2006).

Segundo Oliveira (2007) resultados tão diversos são possíveis porque a complexação de um composto com ciclodextrina implica mudanças estruturais e conformacionais do mesmo, formando nanoesferas com mudanças estruturais. Estas mudanças provavelmente refletem sobre as propriedades antimicrobianas.

Quanto à atividade antibacteriana direta, também existem divergências entre os estudos. Enquanto que Oliveira (2007) demonstrou falta de atividade antibacteriana da β -CD contra cepas de *Porphyromonas gengivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, estudo realizado por Uekama (2004) relatou uma ação direta de ciclodextrinas sobre a membrana, causando lise celular, devido a remoção do colesterol presente nas membranas, aumentando sua fluidez.

3.4 Bactérias

A resistência bacteriana aos fármacos está diretamente relacionada à estrutura de cada tipo de bactéria (BLAIR et al., 2014). As bactérias Gram-positivas possuem uma parede celular espessa e contínua de peptidoglicano, enquanto que as bactérias Gram-negativas possuem uma camada fina e não contínua recoberta por uma membrana externa (TORTORA et al., 2012).

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* são importantes bactérias patogênicas humanas, com cepas resistentes a vários agentes antimicrobianos de importância para a saúde pública, podendo, desta forma, ser utilizadas no monitoramento da resistência à antibióticos (BOSS; OVERESCH; BAUMGARTNER, 2016).

3.4.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva presente na microbiota normal do corpo humano, colonizando a nasofaringe humana e a pele de 30% da população de forma assintomática, sendo, pois, um patógeno oportunista, responsável por diversas infecções hospitalares e comunitárias, que variam desde lesões superficiais na pele e tecidos moles a endocardites e sepses. É, ainda, responsável por 45% das toxinfecções em todo o mundo (FRIDKIN et al., 2005; FITZGERALD, 2014; CROSBY et al., 2016).

Diversos mecanismos podem explicar sua capacidade de provocar doenças, entre os quais: presença de cápsula celular, camada de peptidoglicano, ácidos teicoicos, síntese de enzimas e toxinas extracelulares (COUTINHO et al., 2010b; NOSTRO et al., 2004). Dentre os mecanismos presentes no *S. aureus* capazes de protegê-lo das defesas naturais do corpo humano, a formação de biofilme relacionado à expressão de genes de resistência tem destaque na resistência da espécie contra antibióticos (SCHWARTBECK et al., 2016).

Entre as cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, destacam-se a *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina (SARO), *S. aureus* resistentes à oxacilina adquiridos na comunidade (AC-SARO) e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA). As duas primeiras surgiram ao longo da década de 60, e apresentavam resistência aos antibióticos β -lactâmicos (FINAN et al., 2001; SOUSA et al., 2011). Cepas de MRSA estão ligadas a genes de prevalência muito alta (acima de 85%) em países da África (CONCEIÇÃO et al., 2016), apresentando taxas de mortalidade próximas a 20% em todo mundo (KLEVENS et al., 2007; CROSBY et al., 2016).

3.4.2 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é a bactéria Gram-negativa mais conhecida pela comunidade científica, devido o seu uso em laboratórios como modelo bioquímico e genético (TENAILLON et al., 2010). É uma espécie versátil, habitando o trato digestivo inferior dos vertebrados de forma comensal, sendo a bactéria aeróbica mais prevalente do trato digestivo humano, atingindo uma densidade de 10^8 unidades formadoras de colônias por grama de fezes (SMATI et al., 2013; CLERMONT et al., 2016). Apesar de integrante da microbiota intestinal, cepas virulentas podem causar infecções responsáveis por cerca de 1 milhão de mortes humanas anualmente (LESCAT et al., 2016; TOURRET et al., 2016; TENAILLON et al., 2010). Uma das infecções mais relacionadas a cepas resistentes de *E. coli* são as infecções do trato urinário (ITUs), respondendo estas, por 50-90% de todas as ITUs (TOURRET et al., 2016; FOXMAN, 2010).

Distinguem-se três grandes fenótipos de *E. coli*: E.C. não patogênico, encontrada em doentes imunocompetentes; E.C. patogênico intestinal (InPEC), associados com diarreia leve a grave em seres humanos; e E.C. patogênico extra-intestinal (ExPEC), responsáveis por infecções fora do trato digestivo humano, tais como infecções do trato urinário, meningite, abscessos e septicemia (TOURRET et al., 2016; KAPER et al., 2004). As cepas de ExPEC causadoras de ITUs expressam fatores de virulência que permitem-nas migrar e se instalarem no trato urinário, os quais incluem adesinas responsáveis pelo reconhecimento de receptores, secreção de proteases e toxinas e mecanismos para absorção de ferro do hospedeiro (FLORES-MIRELES et al., 2015). Cepas patogênicas de *E. coli* adquirem resistência aos antibióticos facilmente, podendo esta resistência estar associada a mutações de origem plasmídica ou cromossômica (CLERMONT et al., 2016).

Estirpes multirresistentes de *E. coli* estão se tornando uma preocupação mundial em termos de saúde pública, devido sua capacidade de inativar cefalosporinas de terceira geração (drogas usadas no tratamento de infecções por cepas de *E. coli*), através da produção de enzimas β -lactamases de espectro alargado (ESBL) mediadas por plasmídeos (NGUYEN et al., 2016). Tais cepas, responsáveis por bacteremias graves com taxas de letalidade entre 5 a 30%, têm se propagado nos últimos anos, aumentando a resistência de *E. coli* à maioria dos antibióticos (CLERMONT et al., 2016). Elevadas prevalências de *E. coli* produtoras de ESBL foram relatadas em países asiáticos, alcançando a taxa de 65,0% na China, sendo transmitidas através da cadeia alimentar. Estudo sobre estas estirpes demonstraram altas taxas de

resistência à antibióticos das classes dos aminoglicosídeos, sulfonamidas e penicilinas, alcançando 100% para a ampicilina (NGUYEN et al., 2016).

3.4.3 *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa versátil, não fermentadora, capaz de se adaptar a diversos tipos de ambientes, desde os mais favoráveis aos mais pobres em termos nutricionais (VAZ et al., 2016), desenvolvendo-se em diversos nichos ecológicos (STOVER et al., 2000).

É um agente patogênico oportunista, responsável por infecções pulmonares em pacientes imunocomprometidos (HALL et al., 2017). Cepas patogênicas surgiram devido mudanças ambientais relacionadas ao uso de antimicrobianos, que forçaram o desenvolvimento de fatores para competirem com outras bactérias do meio e de mecanismos de resistência aos antibióticos, tornando as infecções por *P. aeruginosa* difíceis de tratar (STOVER et al., 2000). É responsável por causar uma grande variedade de infecções agudas e crônicas com relevantes índices de morbi-mortalidade, principalmente entre os pacientes imunocomprometidos ou com condições clínicas pré-existentes, tais como HIV, insuficiência renal e insuficiência cardíaca congestiva (DAVIS; BROWN, 2016; JORGENSEN; FERRARO, 2009).

As principais infecções causadas por *P. aeruginosa* são Infecções do Trato Urinário (ITUs), pneumonia (STOVER et al., 2000) e infecções no trato respiratório inferior, apresentando uma taxa de 30% de resistência aos antibióticos padrões (DAVIS; BROWN, 2016; AKPAKA et al., 2002). Fatores específicos determinam a atividade patogênica observada em cepas de *P. aeruginosa*, tais como alterações fenotípicas, formação de biofilme e expressão de fatores de virulência (RIOU et al., 2016). Entre os vários fatores de virulência secretados por *P. aeruginosa* estão a produção de toxinas, lipases e proteases (STOVER et al., 2000; MAURA et al., 2016). Das quatro vias de secreção de proteases relacionadas com virulência de bactérias Gram-negativas, três delas são encontradas em *P. aeruginosa* (proteína de transporte ABC AprD, proteína de fusão de membrana AprE e proteína de membrana externa da família AprF) (STOVER et al., 2000).

Pseudomonas aeruginosa é capaz de realizar adaptações genotípicas e fenotípicas durante a infecção (VAZ et al., 2016) e devido essa propriedade, ela é capaz de gerar cepas resistentes durante o tratamento (RIOU et al., 2016). Essas adaptações incluem

impermeabilidade da membrana, bomba de efluxo, formação de biofilme e expressão de enzimas que inativam os antibióticos (DAVIS; BROWN, 2016; LANDMAN et al., 2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

Folhas de *Hyptis martiusii* Benth (OEHM) foram selecionadas e colhidas por Andreza Guedes Ramos Barbosa, na Floresta Nacional do Araripe, no Sítio Barreiro Grande, 7°21'50" S e 39°28'39" W, altitude 930m, em Crato-CE. Um voucher do espécime foi depositado no Herbário Carirense Dárdano de Andrade Lima - HCDAL da Universidade Regional de Cariri – URCA, sob o número 8394, identificado pela Prof. Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva. As folhas foram utilizadas no processo de obtenção do óleo essencial.

4.2 Compostos Químicos

O Óleo Essencial de *Hyptis martiusii* Benth (OEHM) foi cedido pelo Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (LFQM) da Universidade Regional do Cariri – URCA. A composição química do óleo foi caracterizada por Barbosa e colaboradores (2017), encontrando como compostos majoritários o 1,8-cineol (monoterpeno) 34,58 %, o δ -careno (monoterpenos) 21,58 %, a Cânfora (terpenoide) 5,17%, o Limoneno (monoterpeno) 4,94 %, o Germacreno B (sesquiterpeno) 3,39 % e o α -pineno (monoterpeno) 2,98 %. A β -Ciclodextrina foi adquirida junto à empresa Sigma-Aldrich® (EUA) e o complexo do EOHM/ β -Ciclodextrina foi preparado no Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Sergipe.

4.3 Cepas Bacterianas

As bactérias utilizadas nos testes foram obtidos através de linhagens cultivadas no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA). Foram utilizadas três linhagens de bactérias padrão (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027), e três linhagens multirresistentes (*Escherichia coli* 06, *Staphylococcus aureus* 10 e *Pseudomonas aeruginosa* 15).

O perfil de resistência das bactérias utilizadas está descrito no Quadro nº 3.

Quadro 3: Perfil de Resistência das cepas utilizadas:

Bactéria	Fonte	Perfil de Resistência
<i>Escherichia coli</i> 06	Cultura de Urina	Ca, Cef, Cf, Cro.
<i>Staphylococcus aureus</i> 10	Swab retal	Amc, Amox, Amp, Asb, Azi, Ca, Cef, Cf, Cip, Cla, Clin, Lev, Mox, Oxa, Pen.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 15	Ponta de catéter	Cip, Ctz, Imi, Lev, Mer, Ptz.

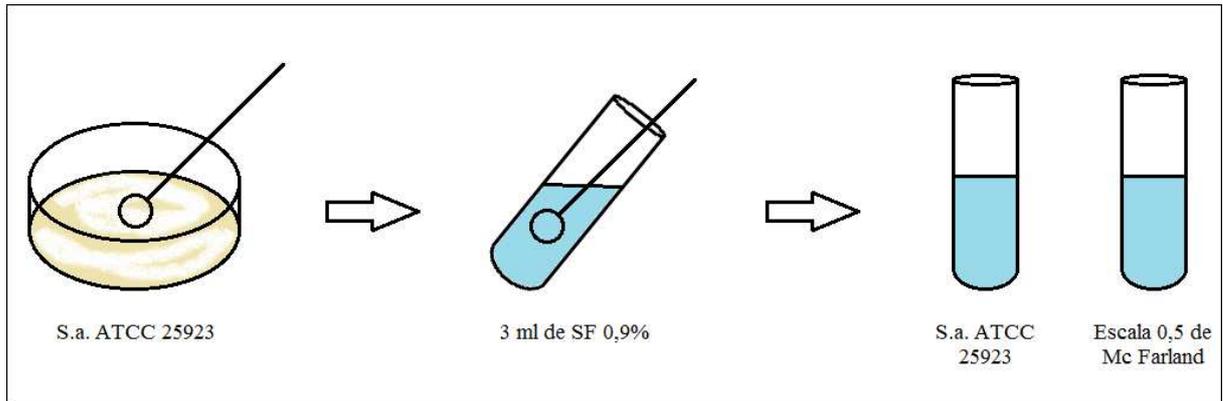
Amp - Ampicilina; Asb - Ampicilina + Sulbactam; Amox - Amoxicilina; Amc - Amoxicilina + Ac. clavulâmico; Azi - Azitromicina; Ca - Cefadroxil; Cf - Cefalotina; Cef - Cefalexina; Cla - Claritromicina; Cro - Ceftriaxona; Ctz - ceftazidima; Cip - Ciprofloxacino; Clin - Clindamicina; Imi - imipenem; Eri - Eritromicina; Oxa - Oxacilina; Lev - Levofloxacino; Mer - meropenem; Mox - Moxifloxacino; Pen - Penicilina; Ptz - Piperacilina + Tazobactam. Fonte: Lima et al. (2016b).

Cada linhagem bacteriana foi previamente cultivada em placas de Petri com HIA (Heart Infusion Ágar) e incubadas na estufa bacteriológica a 37 °C.

A solução foi preparada diluindo 4 g de HIA para cada 100 mL de água destilada. Com a solução já preparada na sua concentração de uso, foram vertidos 20 mL de HIA em cada placa de Petri e esperado sua solidificação dentro do fluxo laminar com luz UV ligada. Após a solidificação, foi feito semeadura das cepas bacterianas em cada placa e levadas à estufa. As bactérias usadas nos testes foram retiradas destas placas após 24 h de crescimento.

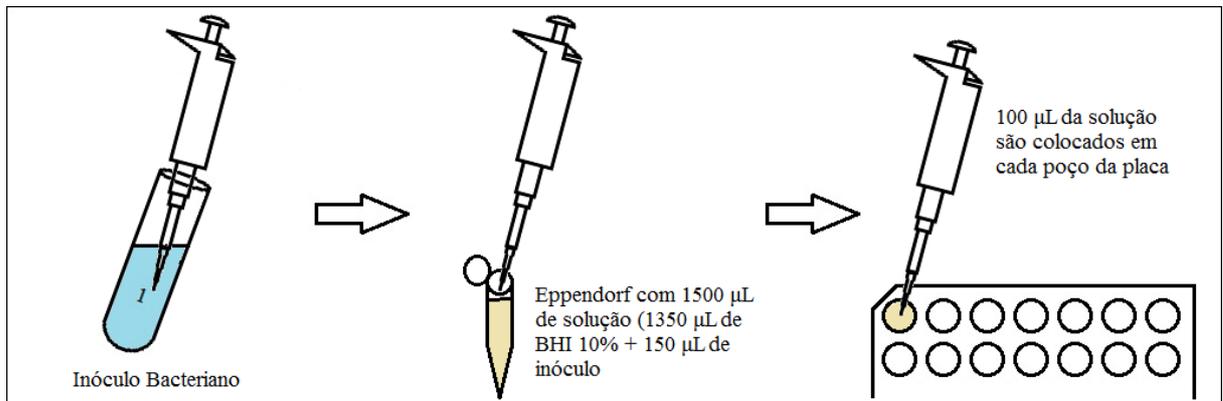
4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM):

Foi adotado o procedimento de microdiluição em caldo recomendado por NCCLS M7-A6 (CLSI, 2008) adaptado. Um arrasto bacteriano foi retirado das placas de Petri previamente cultivadas e então diluídos em tubos de ensaio contendo 3 mL de Soro Fisiológico (SF) a 0,9%. A turvação de cada tubo de ensaio foi então comparada com a turvação da escala 0,5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL), como mostrado na Figura 7. Este procedimento foi feito em triplicata para cada bactéria.

Figura 7: Preparação dos Inóculos.

Fonte: Autor . SA: *Staphylococcus aureus*; ATCC: American Type Culture Collection; SF: soro fisiológico.

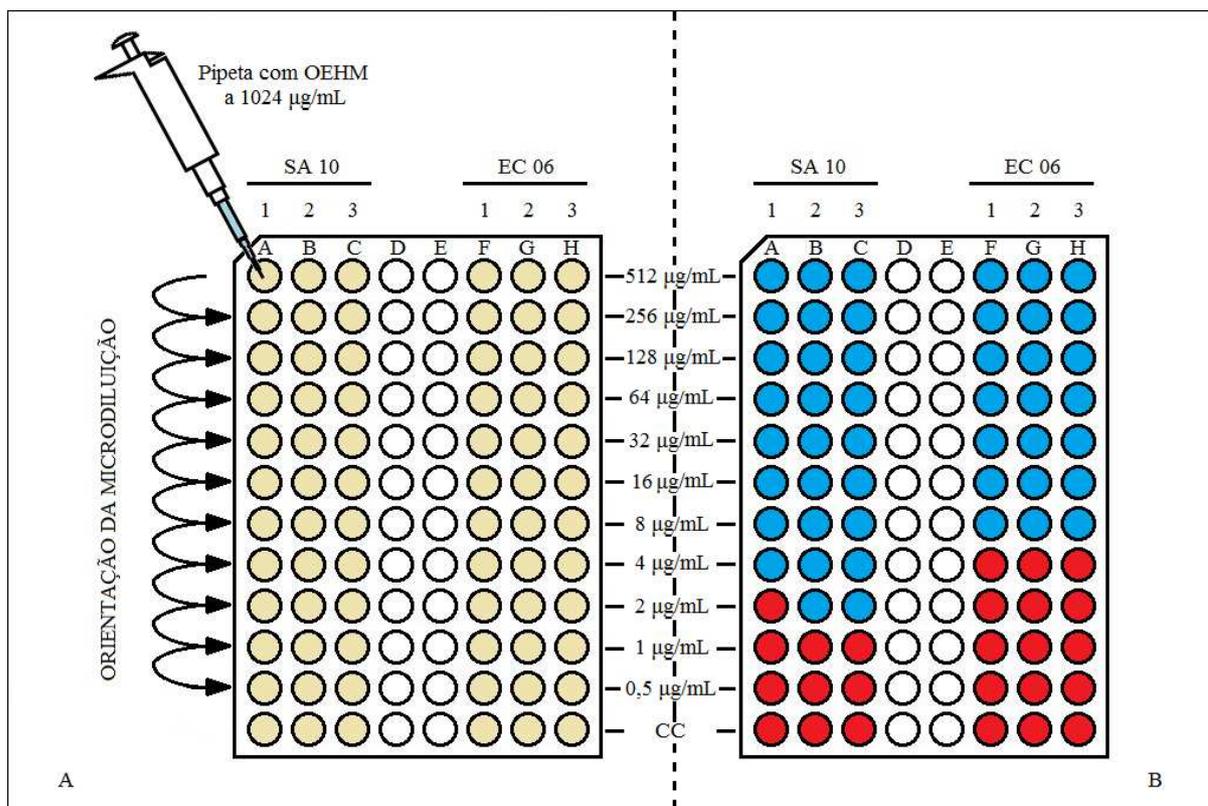
Foram preparados 54 tubos eppendorfs® (6 bactérias x 3 Compostos x Triplicata), 9 para cada estirpe bacteriana, contendo cada um deles 1,5 mL de solução composta por 1350 μL de BHI (Brain Heart Infusion Broth) a 10% e 150 μL do inóculo bacteriano. A preparação dos eppendorfs® está demonstrada na Figura 8.

Figura 8: Preparação do Eppendorf® para as placas de microdiluição.

Fonte: Autor.

A placa foi preenchida no sentido numérico adicionando-se 100 μL da solução final em cada poço. Cada Eppendorf® preencheu uma coluna por placa, e após o preenchimento e identificação, procedeu-se a microdiluição seriada com 100 μL , por coluna, de cada composto a ser testado, conforme Figura 9. As concentrações das substâncias variaram de 512 a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nos poços das placas. Após a microdiluição, as placas foram levadas à incubadora por 24 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$. Após esse período, a determinação da CIM foi feita utilizando-se a adição de 20 μL de resazurina em cada poço e observação ocular após 1 hora (Fig. 9).

Figura 9: Microdiluição seriada (A) e Leitura da placa (B) após adição de rezasurina.



Fonte: Autor . OEHM: óleo essencial de *hyptis martiusii*; CC: controle de crescimento.

A Resazurina apresenta colorações distintas nas suas formas oxidada e reduzida. A forma adicionada no poço foi a oxidada (azul). A mudança da coloração da resazurina de azul para rosa indica que o crescimento bacteriano superou uma densidade celular acima de 10^6 UFC/mL nos poços (GALLUCCI et al., 2009). Após a adição de resazurina, a placa permaneceu por um período de uma hora em temperatura ambiente para que ocorresse a reação (PEREIRA et al., 2015).

A CIM foi averiguada através da observação de turvação visível em cada poço e da mudança de cor provocada pela resazurina. Os poços com as mais baixas concentrações dos produtos testados, nos quais a resazurina permaneceu azul, indicaram a CIM, expressa como média geométrica da triplicata, constatando qual a menor concentração do produto capaz de inibir o crescimento bacteriano (GALLUCCI et al., 2009; SALES et al., 2014).

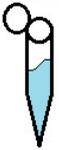
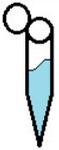
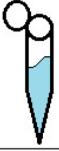
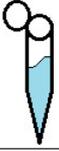
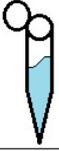
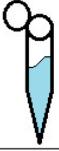
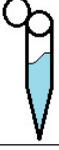
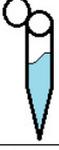
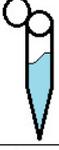
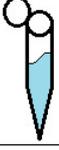
4.5 Efeito Modulador dos Compostos na Atividade de Antibióticos de Uso Clínico

Para verificar se os compostos testados modificariam a ação dos antibióticos frente às cepas bacterianas, foi utilizado o método proposto por Coutinho et al. (2008b). Os compostos foram testados em concentrações não inibidoras do crescimento bacteriano por

ação direta, e para isso foi usada a concentração sub-inibitória (CIM/8) dos compostos para cada bactéria.

Foram preparados tubos eppendorfs® contendo cada um deles, um volume total de 1500 µL, compostos por 150 µL da suspensão bacteriana (correspondente a 10% da solução), o correspondente a CIM/8 µL do composto a ser testado e o volume restante de BHI 10%. Para o controle, foram preparados tubos eppendorfs® com 1,5 mL de solução, contendo 1.350 µL de BHI 10% e 150 µL de suspensão de microrganismos. Os antibióticos usados na modulação foram a norfloxacin, a gentamicina e o imipenem. Os eppendorfs® dos testes e dos controles estão esquematizados na Figura 10.

Figura 10: Composição dos Eppendorfs® utilizados no teste de modulação.

	OEHM	β-Ciclodextrina	OEHM:β-Ciclodextrina	Controles
SA 10	 1.162 µL de BHI 10% 150 µL Inóculo 188 µL Composto	 1.162 µL de BHI 10% 150 µL Inóculo 188 µL Composto	 1.162 µL de BHI 10% 150 µL Inóculo 188 µL Composto	 1.350 µL de BHI 10% 150 µL Inóculo
PA 15	 1.162 µL de BHI 10% 150 µL Inóculo 188 µL Composto	 1.162 µL de BHI 10% 150 µL Inóculo 188 µL Composto	 1.162 µL de BHI 10% 150 µL Inóculo 188 µL Composto	 1.350 µL de BHI 10% 150 µL Inóculo
EC 06	 1.162 µL de BHI 10% 150 µL Inóculo 188 µL Composto	 1.162 µL de BHI 10% 150 µL Inóculo 188 µL Composto	 1.162 µL de BHI 10% 150 µL Inóculo 188 µL Composto	 1.350 µL de BHI 10% 150 µL Inóculo

Fonte: Autor. OEHM: óleo essencial de *hyptis martiusii*; BHI: brain heart infusion.

A placa foi preenchida no sentido numérico adicionando-se 100 µL desta solução em cada poço. Em seguida, 100 µL do antibiótico foi homogeneizado ao primeiro poço, procedendo a microdiluição em série, numa proporção de 1:1 até o penúltimo poço. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata. O procedimento para obtenção dos valores da modulação foram os mesmos utilizados na CIM.

4.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados através de um teste ANOVA de duas vias, utilizando a média geométrica das triplicatas como dado central e o Desvio Padrão, através do programa estatístico *GraphPad Prisma 5.0*. Em seguida foi realizado um teste de Bonferroni post hoc (onde $p < 0,05$ e $p < 0,0001$ são considerado significativo e $p > 0,05$ não significativo).

5 RESULTADOS

Biomedicine & Pharmacotherapy 89 (2017) 201–207



Available online at
ScienceDirect
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
 www.em-consulte.com/en



Physico-chemical characterization and antibacterial activity of inclusion complexes of *Hyptis martiusii* Benth essential oil in β -cyclodextrin



Tatianny A. Andrade^a, Thiago S. Freitas^b, Francielly O. Araújo^a, Paula P. Menezes^a, Grace Anne A. Dória^a, Alessandra S. Rabelo^a, Lucindo J. Quintans-Júnior^c, Márcio R.V. Santos^c, Daniel P. Bezerra^d, Mairim R. Serafini^a, Irwin Rose A. Menezes^e, Paula Santos Nunes^c, Adriano A.S. Araújo^a, Maria S. Costa^b, Fábria F. Campina^b, Antonia T.L. Santos^b, Ana R.P. Silva^b, Henrique D.M. Coutinho^{b,*}

^aPharmacy Department, Federal University of Sergipe, Sergipe, Brazil

^bDepartment of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, Ceará, Brazil

^cPhysiology Department, Federal University of Sergipe, Sergipe, Brazil

^dGonçalo Muniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Bahia, Brazil

^eDepartment of Mineralogy and Geotectonics, Institute of Geosciences, University of São Paulo-SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 October 2016

Received in revised form 19 January 2017

Accepted 28 January 2017

Keywords:

Essential oil

Hyptis martiusii

β -CD

Inclusion complex

Modulatory-antibiotic activity

Antibacterial activity

ABSTRACT

Cyclodextrins (CDs) have been used as important pharmaceutical excipients for improve the physicochemical properties of the drugs of low solubility as the essential oil of *Hyptis martiusii*. This oil is important therapeutically, but the low solubility and bioavailability compromises your use. Therein, the aim of this study was to obtain and to characterize physico-chemically the samples obtained by physical mixture (PM), paste complexation (PC) and slurry complexation (SC) of the essential oil *Hyptis martiusii* (EOHM) in β -CD, and to compare the antibacterial and modulatory-antibiotic activity of products obtained and oil free. The physicochemical characterization was performed by differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry/derivative thermogravimetry (TG/DTG), scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD) and Karl Fischer titration. Additionally, the antibacterial tests were performed by microdilution technique. Thus, it was observed that the PM method showed low complexing capacity, unlike PC and SC in which it was observed the formation of inclusion complexes. In addition, the second stage of the TG/DTG curves showed that SC was the best method inclusion with mass loss of 6.9% over the PC that was 6.0%. The XRD results corroborate with the results above suggesting the formation of new solid phase and the SEM photomicrographs showed the porous surface of the samples PC and SC. The essential oil alone demonstrated an antibacterial and modulatory effect against the *S. aureus* and the Gram negative strain, respectively. However, the β -CD and the inclusion complex did not demonstrate any biological activity in the performed antibacterial assays.

© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

The *Hyptis* genus belongs to the Lamiaceae family and is used in the folk medicine as an alternative therapy in the diseases treatment. Some of these species, such as *Hyptis fruticosa*, *Hyptis*

suaveolens, *Hyptis pectinata*, are characterized by the presence of essential oils with pharmacological properties, such as antibacterial [1], antiseptic [2], antiulcer [3], antinociceptive [4], anti-inflammatory [5,6], among others.

The species *Hyptis martiusii* Benth, known as “cidreira do campo” or “cidreira brava” is a small shrub, commonly found in the northern, southeastern and northeastern Brazil [7]. In folk medicine, infusion or decoction of *Hyptis martiusii* leaves are used to combat diseases of the gastrointestinal tract while the decoction of the root misused to combat inflammation of ovaries [8]. In studies with *Hyptis martiusii* species were identified a number of

* Corresponding author at: Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato, Ceará, Brazil. Tel.: +55 88 3102 1212/88 3102 1204.

E-mail address: hdmcoutinho@gmail.com (H.D.M. Coutinho).

activities, including cytotoxic and antiproliferative effects in certain tumor cell lines [9,10], insecticidal activity [11], antimicrobial [12] and antiulcerogenic [13], highlighting the pharmacological potential of this specie.

In this context, essential oils can be defined as complex mixtures of volatile organic compounds produced as secondary metabolites of plants. Many of them have demonstrated antibacterial activity, alone or associated with antibiotics, by different mechanisms, diffculting the bacterial adaptation and avoiding the resistance surveillance [14,15]. They are made up of hydrocarbons and oxygenate compounds [16]. In the literature, the *Hyptis martiusii* essential oil (EOHM) is described as comprised of mono- and sesquiterpenes, and has as major component 1,8-cineole (24.3%), δ -3-carene (22.5%), bicyclogermacrene (6.3%) and β -carophyllene (6.2%) [17].

Thus, the incorporation of volatile oils in cyclodextrins has been applied to protect the compounds against temperature, oxidation, evaporation and humidity [18]. The use of complexing molecules can be used to combat the bacterial resistance also, reducing the concentration of the drugs and the necessary doses used in the treatment [19]. Besides, the use of molecules with characteristics of to form inclusion complex as CDs associated with antimicrobial drugs can be enhanced the water solubility and extend the half-life in the system of these drugs [20].

Cyclodextrins (CDs) are oligosaccharides composed of 6, 7, 8 or 9 glucopyranose units (α -, β -, γ - or δ -CD, respectively), with a relatively hydrophilic surface and a hydrophobic central cavity [21,22]. The cyclodextrin inclusion complex formation has been successfully applied to enhance the chemical stability, solubility and bioavailability of poorly soluble compounds [22–24]. The minimum requirement for the complex to be formed is the compatibility of sizes and geometries between the CD cavity and the guest. It has also to consider the hydrophobic character of the guest, thus the polarity is a conditioning factor in the formation of the inclusion complex [25].

The objective of this study was to elucidate the complexation of EOHM in β -CD, by different methods, and to evaluate the antibacterial and modulatory-antibiotic effect of the best formulation obtained in comparison of oil free. The samples were characterized by differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry/derivative thermogravimetry (TG/DTG), scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD) and moisture content determined by Karl Fischer titration method.

2. Material and methods

2.1. Material

The β -CD (Lot: #041 M1759V; purity $\geq 97\%$) was purchased from Sigma-Aldrich (USA) and the EOHM was extracted by hydrodistillation of *Hyptis martiusii* leaves collected in the savannah area of the Chapada do Araripe (Barreiro Grande Farm, Crato-Ce, 7°21'50" S; 39°28'39" W, elevation: 930 m) in May/2012. A voucher of the plant specimen was deposited in the Carirense Dárdano de Andrade Lima Herbarium – HCDAL of the Regional University of Cariri – URCA, under registration number 8394. The plant was identified and classified by Prof. Maria Arlene Pessoa da Silva.

2.2. Sample preparation

2.2.1. Extraction of the essential oil

Fresh leaves samples (3.950 g) from their natural habitat were collected, washed in running water, pulverized submitted to hydrodistillation (4h) using a modified cleverger-type apparatus. The biphasic mixture is formed by the essential oil in the superior phase and the aqueous phase, which is separated through

decantation, dried over anhydrous Na_2SO_4 , kept in amber bottle flask and maintained in temperature lower than 4°C. The yield (0.34%, w/w) of essential oil was calculated based on oil volume produced and fresh leaves mass in kg. The oil of yellowish coloration and characteristic odor was evaluated.

3. Complexation with β -cyclodextrins (β -CD)

The samples were prepared by techniques of physical mixture (PM), paste complexation (PC) and slurry complexation (SC). Thus, in the PM method, EOHM (154 mg, based on the molecular weight of the major component, 1,8-cineole) and the β -CD (1135 mg) were mechanically mixed by 10 min in the molar ratio of 1:1 in ambient temperature. For to obtain the PC, the EOHM (154 mg) and β -CD (1135 mg) were mixed with the aid of a mortar and pestle (1:1 molar ratio) and adding then 2.0 mL of distilled water with constant manual stirring until forming a paste. Then, the material was kept in a desiccator until dry. Finally, the SC was performed by mechanical mixture of EOHM (154 mg) and β -CD (1135 mg) in a molar ratio of 1:1 and then 20 mL of water was added, and remained under constant magnetic stirring at 150 rpm for 36 h. Subsequently, the material was stored in a desiccator until dry.

3.1. Differential scanning calorimetry (DSC)

The EOHM, β -CD, PM and of inclusion complexes samples were subjected to DSC test. The DSC curves were obtained using a DSC-50 cell, from Shimadzu, using a heating rate of 10°C/min. The DSC curves were obtained between 25 and 500°C under a dynamic atmosphere of N_2 (50 mL/min), employing aluminum capsules (Al) containing ~2 mg of the samples. The DSC cell was calibrated with indium (melting point 156.6°C; $\Delta H_{\text{fus}} = 28.54$ J/g) and zinc (melting point 419.6°C).

3.2. Thermogravimetry/derivative thermogravimetry (TG/DTG)

The EOHM, β -CD, PM and inclusion complexes samples were tested in a TG/DTG apparatus. The TG/DTG curves were obtained using TGA-51 thermobalance, from Shimadzu, using a heating rate of 10°C/min. The TG/DTG were conducted at 25–900°C range under a dynamic atmosphere of N_2 (50 mL/min) using platinum (Pt) capsules containing ~3 mg of the samples. The thermogravimetric system was verified using $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, reference substance, in accordance with the ASTM standard.

3.3. Determination of moisture content by the Karl Fischer method

The moisture content of the PM and the inclusion complexes were determined by Karl Fischer method, model Titrimo Plus KF870 (Metrohm), and methanol (Fluka) was used as a titration solution. Analyses were performed in triplicate.

3.4. Scanning electron microscopy (SEM)

The β -CD, PM, PC and SC samples were mounted on aluminum stubs subsequently plated with gold beams and viewed in an electron microscope (JEOL JSM-6390-LV model) in acceleration voltage of 12 kV.

3.5. X-ray diffraction (XRD)

The X-ray diffraction of the products were obtained in a Siemens D 5000 equipment model with CuK_α tubes, in the range of 3–65° (2 θ) and 1s at each step.

3.6. Microbial strains

The bacteria used in the assays were obtained in the Laboratory of Microbiology and Molecular Biology – LMBM, of Regional University of Cariri – URCA. So, it was used Gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and a multidrug resistant *S. aureus* 10) and Gram negative strains (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and a multidrug resistant *E. coli* 06 and *P. aeruginosa* 15). The resistance profile was previously described by Lima et al [26].

3.7. Antibacterial and antibiotic assays

For this assay, it was performed the microdilution method using microtiter plates with 96 wells [27]. The assays of antibacterial and modulatory-antibiotic activity were performed as reported by Coutinho et al. [12]. All assays were performed in triplicate and using the follow compounds: EOHM, β -CD and the inclusion complex obtained by SC method with concentrations ranging between 1024 and 1 μ g/mL. The microtiter plates were incubated by 24 h at 37 °C. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined using 20 μ L of resazurine 0.01% on each well and observing the change of colour. The MIC is defined as the lower concentration that inhibits the bacterial growth [28].

3.8. Statistical analysis

The bacterial results were analysed using the geometric means followed by ANOVA two-way with Bonferroni post hoc test ($P < 0.05$ is considered significant).

4. Results and discussion

4.1. Complexation of EOHM in β -CD

The DSC curve of EOHM showed an endothermic event at temperature range 28–140 °C corresponding to its volatilization (Fig 1). The β -CD curve showed three endothermic events followed by an exothermic and subsequent decomposition step. The endothermic events occurred in the range 32–121, 205–240 and 285–344 °C. The first endothermic event was related to water loss of β -CD [29] and the second endothermic event was a physical process attributed to the change of crystalline phase [30]. Then there was observed melting followed by degradation of β -CD.

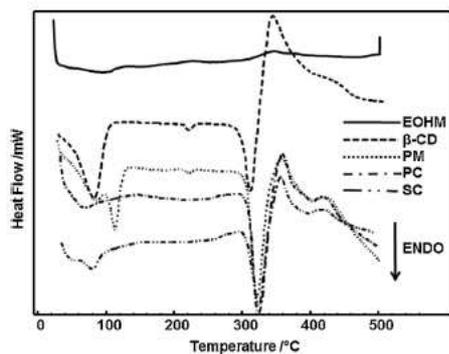


Fig. 1. DSC curves in dynamic N_2 atmosphere of EOHM, β -CD, PM and the complex EOHM: β -CD obtained from PC and SC methods.

The DSC curve of PM presented four endothermic events followed by decomposition. The events occurred in the following temperature ranges: 67–97, 99–132, 212–234 and 292–356 °C. The first two events represented a sum of EOHM and β -CD. The third peak corroborated crystalline phase transition of β -CD and finally, the melting of β -CD followed by decomposition.

DSC curves of PC and SC were different from PM and isolated raw materials and showed endothermic peaks followed by decomposition. In the PC events occurred in the following temperature range: 30–148 and 295–358 °C. In the SC curve, the endothermic events occurred at 35–61, 62–134 and 297–356 °C. In curves of these last two methods were observed significant differences mainly related to the reduction of the intensity of the peak corresponding to loss of water and disappearance of the endothermic event related to crystalline phase transition of the pure β -CD.

The formation of inclusion complexes was also studied by TG/DTG curves of EOHM, β -CD, PM, PC and SC samples. Fig. 2 shows the TG/DTG curves of the samples and Table 1 lists mass losses calculated from specific intervals for each material studied in this paper and water percentages calculated by the Karl Fischer method.

The TG results showed that the EOHM volatilized up to 170 °C, with a weight loss of 100% as showed in the DSC technique. In the same temperature β -CD showed mass loss of 12.2% ($\%_{H_2O} = 13.42$) attributed to the molecule dehydration (Step 1). Furthermore, between 170 and 280 °C, there was no significant weight loss, characterizing the crystalline phase transition described in the corresponding DSC curve. Thermal decomposition occurred after 280 °C and through the DTG curve, it was confirmed that the maximum decomposition temperature of β -CD is 343 °C [31]. In PC and SC curves, it was observed that in the range of 170–280 °C (Table 1) the mass losses were 6.0 and 6.9%, respectively. These weight loss percentages were attributed to release of complexed EOHM, since the free oil and β -CD had no significant weight loss at this stage. In addition, the PM curve showed a low percentage of weight loss in the same step, suggesting that this preparation method is not effective in the complexation of EOHM in the β -CD cavity. Furthermore, through the percentage of water values obtained by Karl Fischer titration, as shown in Table 1, it was observed a decrease in the percentage of water in the complex when compared with the β -CD. This decrease can be indicative of the formation of the inclusion complex, since the water molecules of β -CD cavity were replaced by guest molecules [32].

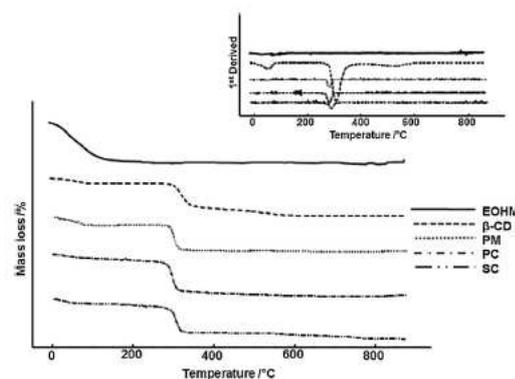


Fig. 2. TG/DTG curves in dynamic N_2 atmosphere of EOHM, β -CD, PM and the complex EOHM: β -CD obtained from PC and SC methods.

Table 1

Mass loss percentage obtained by TG of EOHM, PM, PC and SC and Water percentages calculated by Karl Fischer titration.

Sample	% H ₂ O (KF)	Δm_1 (%)	Δm_2 (%)	Δm_3 (%)	Δm_4 (%)
		30–170 °C	170–280 °C	280–400 °C	400–900 °C
EOHM	0.52 ± 0.03	100.0	–	–	–
β-CD	13.42 ± 0.69	12.2	0.3	65.1	22.4
PM	13.55 ± 0.58	18.4	0.5	69.1	12.0
PC	12.00 ± 0.38	13.1	6.0	84.2	6.7
SC	12.59 ± 0.24	10.2	6.9	70.1	12.8

Fig. 3 shows the SEM images of β-CD, PM, PC and SC, in different magnifications. The β-CD showed different sizes crystals of rectangular shape with some particles adhered on its surface, as already described by other authors [33,34]. In referring to the PM micrograph, no difference was observed between the particles shape compared with the β-CD, suggesting the low complexing ability of this method as reported by the thermoanalytical techniques described above. As for the PC and SC samples, they exhibited different forms when compared to PM and β-CD. These preparations appeared in the form of pellets with a porous surface

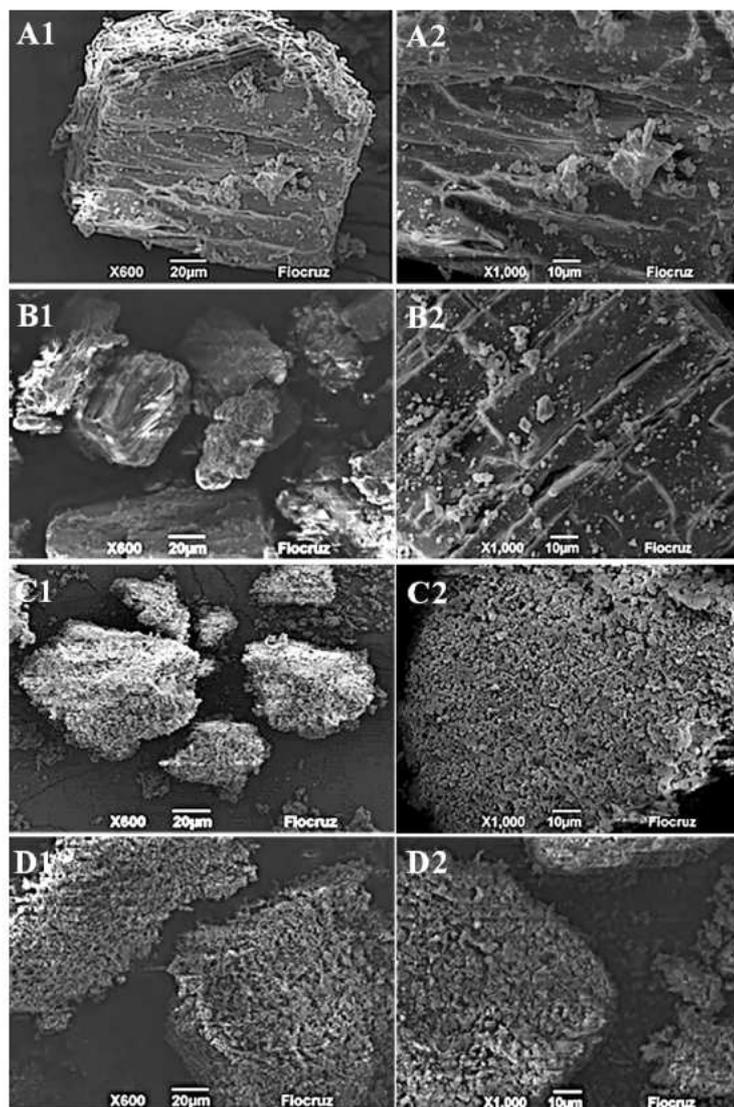


Fig. 3. Photomicrographs of cross-sections (20 and 10 μm, 1 and 2, respectively) of A: β-CD, B: PM, C and D: EOHM:β-CD obtained by PC and SC methods, respectively.

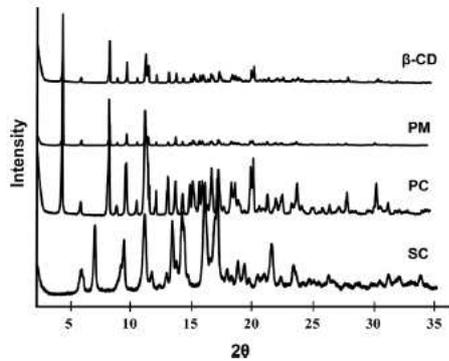


Fig. 4. X-ray diffractograms of β -CD, PM and the complex EOHM: β -CD obtained from PC and SC methods.

Table 2

Minimum inhibitory concentration values ($\mu\text{g/ml}$).

Substances	Bacteria					
	S.A. ATCC 25923	P.A. ATCC 9027	E.C. ATCC 25922	S.A. 10	P.A. 15	E.C. 06
β -CD	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
EOHM	32	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
EOHM: β -CD	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024

S.A. – *Staphylococcus aureus*; P.A. – *Pseudomonas aeruginosa*; E.C. – *Escherichia coli*; β -CD – β -cyclodextrin; EOHM – essential oil of *Hyptis martiusii*.

revealing an apparent interaction in the solid state between the EOHM and β -CD.

Additionally, X-ray diffraction analysis (Fig. 4) has observed the crystalline nature of the samples. Fig. 4 shows that the β -CD had many reflections, features of its crystalline structure. In the PM was observed some β -CD characteristics with substantial reductions in the intensity, suggesting amorphization process. PC and SC were seen some β -CD reflections and the appearance of new peaks,

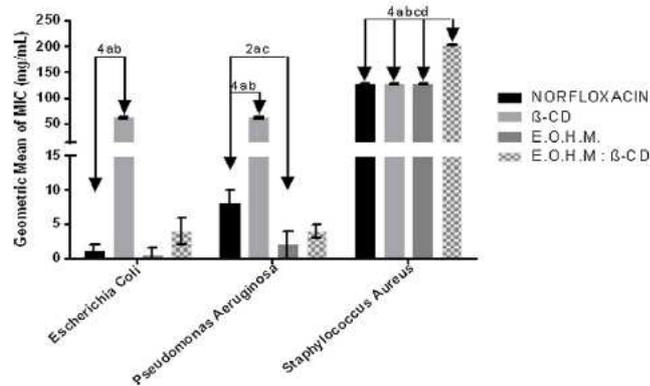


Fig. 5. Modulatory effect of β -CD, EOHM and the complex EOHM: β -CD in the antibiotic activity of norfloxacin against multidrug resistant strains of *S. aureus* 10, *E. coli* 06 and *P. aeruginosa* 15. Control Norfloxacin (a), β -CD (b), EOHM (c) and EOHM: β -CD (d). The numbers 1–4 express the significance of the association between these substances + norfloxacin. The number 4 means $P < 0.0001$ when compared with the control.

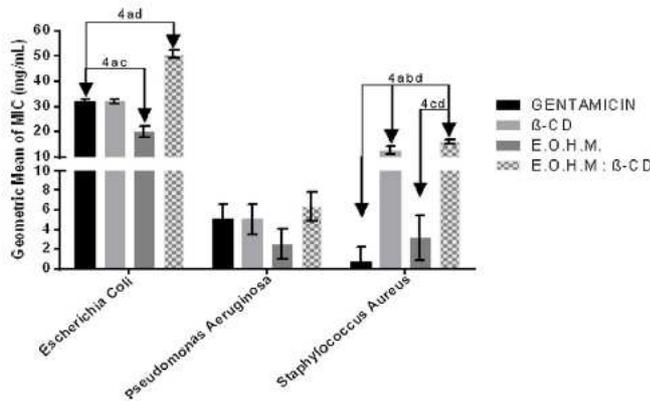


Fig. 6. Modulatory effect of β -CD, EOHM and the complex EOHM: β -CD in the antibiotic activity of gentamicin against multidrug resistant strains of *S. aureus* 10, *E. coli* 06 and *P. aeruginosa* 15. Control gentamicin (a), β -CD (b), EOHM (c) and EOHM: β -CD (d). The numbers 1–4 express the significance of the association between these substances + gentamicin. The number 4 means $P < 0.0001$ when compared with the control.

which indicated the formation of a new solid phase, thus indicating the formation of the inclusion complex EOHM/ β -CD. Similar results were obtained by Toropainen [35].

4.2. Antibacterial activity

The antimicrobial activity was evaluated by Minimum Inhibitory Concentration – MIC (Table 2). The MICs for all compounds were $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$, except when the essential oil of *Hyptis Martiusii* was used against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (MIC = $32 \mu\text{g/mL}$), according with previous work by Coutinho et al. [12].

The essential oils of several plants from the genus *Hyptis* demonstrated the best result against Gram-positive bacteria. This fact can be explained due the external membrane present on Gram-negative bacteria, with suppress the association of the lipophilic compounds of the essential oil with the cell membrane [36,37].

Besides all effects reported as solubility enhancement, better adherence to the bacterial cell wall and higher bioavailability of the drug [38], the β -CD alone or associated with the EOHM demonstrated a MIC $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$. Assays using gamma-CD revealed none effect against none strains of *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* [39] demonstrating that CD has not an increased antibiotic activity.

4.3. Antibiotic modulatory effect

The EOHM demonstrated a synergism when in association with norfloxacin against *P. aeruginosa* 15, with a MIC reduction of 8 for $2 \mu\text{g/mL}$ (Fig. 5). This effect can be explained by the high amount of terpenes in the EOHM that enhances the influx of antibiotics by alterations in the cell membrane permeability [40].

β -CD demonstrated different antagonistic effect when associated with the antibiotics and against all bacteria assayed. This antagonism effect from the chelating effect of the β -CD with the antibiotics [41,42].

The complex EOHM: β -CD demonstrated higher MICs when compared with the EOHM alone, demonstrating that interaction with the β -CD affected the modulatory effect of the EOHM. Thus, the inclusion complexes demonstrated different physicochemical properties in comparison with the pure compounds, indicating the existence of new manner or molecular organization and chemical interaction with cell systems [43].

Associated with the gentamicin, the EOHM demonstrated synergism against *E. coli* 06, reducing the MIC of 32 – $20.15 \mu\text{g/mL}$ (Fig. 6). Similar results were observed in the essential oil of *Cymbopogon citratus*, a natural complex rich in compounds as terpenes that reduced the MIC of *E. coli* of 156.25 – $39.06 \mu\text{g/mL}$ [44].

Other works using natural products from *Hyptis Martiusii* as the ethanol extract demonstrated a synergism against the strain *E. coli* 27. This fact was associated with the inhibition of efflux systems identified in this bacterium by the use of chlorpromazine (CPZ), causing the same synergistic effect [45] and revealing the possible mechanism of antibiotic activity enhancement.

The β -CD did not demonstrate any modulatory effect against the assayed Gram negative bacteria using gentamicin, however, against the Gram positive one, the effect was an antagonism. When associated with the gentamicin, the complex EOHM: β -CD demonstrated antagonism against the Gram negative and Gram positive bacteria assayed. When compared with the essential oil alone, we can observe that the complexation with β -CD affect directly the modulatory activity of the EOHM [46,47].

5. Conclusions

Based on these results, it was possible to observe that the complexation of EOHM in β -CD cavity occurred in the preparations of PC and SC. Additionally, the second stage of TG (170 – 280°C) showed that the SC was the best method since the inclusion showed a weight loss of 6.9%, suggesting that the complexed oil required a higher temperature to decompose compared to free EOHM, that lost 100% of its mass up to 170°C .

The results obtained demonstrated the anti-staphylococcal activity of EOHM and a synergistic effect when associated with the gentamicin against the Gram negative bacteria. Indeed, this essential oil is a potential source of compounds to be used in the treatment of bacterial infections. However, the complex EOHM: β -CD and β -CD alone have not antibacterial neither modulatory antibiotic activity. This result is related with the β -CD do not interact directly with the lipid bilayer as occur with the EOHM alone. Due this fact, the β -CD do not disrupt neither affect the cell membrane.

Acknowledgements

We would like to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq/Brazil and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Sergipe/FAPITEC-SE for the financial support.

References

- [1] L.K. Souza, C. Oliveira, P.H. Ferri, J.G.D. Oliveira Júnior, A.H.D. Souza Júnior, O.D. F.L. Fernandes, M.D.R.R. Silva, Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98 (2003) 963–965.
- [2] R. Pereda-Miranda, L. Hernández, M.J. Villavicencio, M. Novelo, P. Ibarra, H. Chai, J.M. Pezzuto, Structure and stereochemistry of pectinolides AC, novel antimicrobial and cytotoxic 5, 6-dihydro- α -pyrones from *Hyptis pectinata*, *J. Nat. Prod.* 56 (1993) 583–593.
- [3] C. Takayama, F.M. de-Faria, A.C.A. de Almeida, C.S. Rehen, R.J. Dunder, E.A.R. Socca, C.A. Hiruma-Lima, Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil from *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae), *J. Ethnopharmacol.* 135 (2011) 147–155.
- [4] I.A. Menezes, M.S. Marques, T.C. Santos, K.S. Dias, A.B. Silva, I.C. Mello, A.R. Antonioli, Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis fruticosa* in mice, *Fitoterapia* 78 (2007) 192–195.
- [5] M.D. Bispo, R.H.V. Mourão, E.M. Franzotti, K.B.R. Bomfim, M.D.F. Arrigoni-Blank, M.P.N. Moreno, A.R. Antonioli, Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals, *J. Ethnopharmacol.* 76 (2001) 81–86.
- [6] P. Dos, P. Menezes, A.A.S. Araújo, A.A. Doria, L.J. Quintans-Junior, M.G.B. Oliveira, M.R.V. dos Santos, I.L. Matos, Physicochemical characterization and analgesic effect of inclusion complexes of essential oil from *Hyptis pectinata* L. Poit leaves with β -cyclodextrin, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 16 (2015) 440–450.
- [7] C.D.F.C. Almeida, U.P. Albuquerque, Check-list of the family Lamiaceae in Pernambuco, Brazil, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 45 (2002) 343–353.
- [8] M.D.F. Agra, K.N. Silva, L.J.L.D. Basílio, P.F.D. Freitas, J.M. Barbosa-Filho, Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil, *Rev. Bras. Farmacogn.* 18 (2008) 472–508.
- [9] L.V. Costa-Lotufo, E.C.C. Araújo, M.A.S. Lima, M.E.A. Moraes, C. Pessoa, E.R. Silveira, M.O. Moraes, Antiproliferative effects of abietane diterpenoids isolated from *Hyptis martiusii* Benth (Labiatae), *Pharmazie* 59 (2004) 78–79.
- [10] E.C.D.C. Araújo, M.A.S. Lima, R.C. Montenegro, M. Nogueira, L.V. Costa-Lotufo, C. Pessoa, E.R. Silveira, Cytotoxic abietane diterpenes from *Hyptis martiusii* Benth, *Z. Naturforsch. C* 61 (2006) 177–183.
- [11] J.G.M. Costa, F.F.G. Rodrigues, E.C. Angélico, M.R. Silva, M.L. Mota, N.K.A. Santos, T.L.G. Lemos, Chemical-biological study of the essential oils of *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* and *Syzygium aromaticum* against larvae of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*, *Rev. Bras. Farmacogn.* 15 (2005) 304–309.
- [12] H.D.M. Coutinho, J.G.M. Costa, J.P. Siqueira-Júnior, E.O. Lima, In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA strains, *Rev. Bras. Farmacogn.* 18 (2008) 670–675.
- [13] G.F.R. Caldas, I.M. Amaral Costa, J.B.R. Silva, R.F. Nóbrega, F.F.G. Rodrigues, J.G. M. Costa, A.C. Wanderley, Antitumor activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae), *J. Ethnopharmacol.* 137 (2011) 886–892.
- [14] D.J. Daferera, B.N. Zogas, M.G. Polissiou, The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Crop Protect.* 22 (2003) 39–44.

- [15] R.J. Pereira, M.G. Cardoso, Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits, *J. Biotechnol. Biodivers.* 3 (2012) 146–152.
- [16] L.S. Nerio, J. Olivero-Verbel, E. Stashenko, Repellent activity of essential oils: a review, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 372–378.
- [17] E.C. Araújo, E.R. Silveira, M.A.S. Lima, M.A. Neto, I.L. Andrade, M.A.A. Lima, A.L. M. Mesquita, Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martiusii* Benth, *J. Agr. Food Chem.* 51 (2003) 3760–3762.
- [18] R.N. Marreto, E.E. Almeida, P.B. Alves, E.S. Nicolau, R.S. Nunes, C.R. Matos, A.A. Araújo, Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil, *Thermochim. Acta* 475 (2008) 53–58.
- [19] R.A. Rajewski, V.J. Stella, Pharmaceutical application of cyclodextrins. In vivo drug delivery, *J. Pharm. Sci.* 85 (1996) 1142–1169.
- [20] L. Zhang, D. Pornpattananakul, C.M. Huang, C.M. Hu, Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery, *Curr. Med. Chem.* 17 (2010) 585–594.
- [21] J. Li, X.J. Loh, Cyclodextrin-based supramolecular architectures: syntheses, structures, and applications for drug and gene delivery, *Adv. Drug. Deliver. Rev.* 60 (2008) 1000–1017.
- [22] Y.Y. Hwang, D.C. Shin, Y.S. Nam, B.K. Cho, Characterization, stability, and pharmacokinetics of silybinin/ β -cyclodextrin inclusion complex, *J. Ind. Eng. Chem.* 18 (2012) 1412–1417.
- [23] J. Liu, L. Qiu, J. Gao, Y. Jin, Preparation, characterization and in vivo evaluation of formulation of baicalin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin, *Int. J. Pharm.* 312 (2006) 137–143.
- [24] M.F. Wempe, V.J. Wachter, K.M. Ruble, M.G. Ramsey, K.J. Edgar, N.L. Buchanan, C. M. Buchanan, Pharmacokinetics of raloxifene in male Wistar-Hannover rats: influence of complexation with hydroxybutenyl-beta-cyclodextrin, *Int. J. Pharm.* 346 (2008) 25–37.
- [25] K. Uekama, M. Otagiri, Cyclodextrins in drug carrier systems, *Crit. Rev. Ther. Drug* 3 (1986) 1–40.
- [26] V.N. Lima, C.D.M. Oliveira-Tintino, E.S. Santos, L.P. Morais, S.R. Tintino, T.S. Freitas, Y.S. Geraldo, R.L.S. Pereira, R.P. Cruz, I.R.A. Menezes, H.D.M. Coutinho, Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: gallic acid, caffeic acid and pyrogallol, *Microb. Pathogen.* 99 (2016) 56–61.
- [27] Clinical and Laboratory Standards Institute, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 8th ed., CLSI, 2008.
- [28] G.W.P. Sales, A.H.M. Batista, L.Q. Rocha, N.A.P. Nogueira, Efeito antimicrobiano e modulador do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courbaril*, *L. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 35 (2014) 709–715.
- [29] S. Scirè, S. Giuffrida, C. Crisafulli, P.M. Riccobene, A. Pistone, Liquid phase photo-deposition in the presence of unmodified β -cyclodextrin: a new approach for the preparation of supported Pd catalysts, *J. Mol. Catal. A-Chem.* 353 (2012) 87–94.
- [30] P. Guo, Y. Su, Q. Cheng, Q. Pan, H. Li, Crystal structure determination of the β -cyclodextrin-*p*-aminobenzoic acid inclusion complex from powder X-ray diffraction data, *Carbohydr. Res.* 346 (2011) 986–990.
- [31] G. Astray, C. Gonzalez-Barreiro, J.C. Mejuto, R. Rial-Otero, J. Simal-Gándara, A review on the use of cyclodextrins in foods, *Food Hydrocolloid.* 23 (2009) 1631–1640.
- [32] M.R. Serafini, P.P. Menezes, L.P. Costa, C.M. Lima, L.J. Quintans Jr., J.C. Cardoso, J. R. Matos, J.L. Soares-Sobrinho, S. Grangeiro Jr., P.S. Nunes, L.R. Bonjadin, A.A.S. Araújo, Interaction of *p*-cymene with β -cyclodextrin, *J. Therm. Anal. Calorim.* 109 (2012) 951–955.
- [33] N.G. Hädärugä, F. Ficarica verna Huds. extracts and their β -cyclodextrin supramolecular systems, *Chem. Cent. J.* 6 (2012) 16.
- [34] S. Songkro, N. Hayook, J. Jaisawang, D. Maneenuan, T. Chuhome, N. Kaewnopparat, Investigation of inclusion complexes of citronella oil, citronellal and citronellol with β -cyclodextrin for mosquito repellent, *J. Incl. Phenom. Macrocyd. Chem.* 72 (2012) 339–355.
- [35] T. Toropainen, S. Velaga, T. Heikkilä, L. Matilainen, P. Jarho, J. Carlfors, K. Järvinen, Preparation of budesonide/ γ -cyclodextrin complexes in supercritical fluids with a novel SEDS method, *J. Pharm. Sci.* 95 (2006) 2235–2245.
- [36] W. Nantitanon, S. Chowwanapoonpohn, S. Okonogi, Antioxidant and antimicrobial activities of *Hyptis suaveolens* essential oil, *Sci. Pharm.* 75 (2007) 35.
- [37] P.O. Santos, M.D.J.C. Costa, J.A.B. Alves, P.F.C. Nascimento, D.L.E.M. Melo, A.M. Barbosa Jr., R.C. Trindade, A.F. Blank, M.F. Arrigoni-Blank, P.B. Alves, M.P.F. Nascimento, Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis pectinata*, *Poit. Quim Nova* 31 (2008) 1648–1652.
- [38] K.L.R. Teixeira, Estudo das alterações da membrana celular de Microorganismos por compostos de inclusão de clorexidrina: Beta-ciclodextrina em diferentes proporções molares usando microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.
- [39] V. Hanci, A. Vural, S.Y. Hanci, H.A. Kiraz, D. Ömür, A. Ünver, Avaliação in vitro das características antimicrobianas de sugamadex, *Rev. Bras. Anestesiol.* 64 (2014) 105–108.
- [40] D.S. Ribeiro, D.B. Melo, A.G. Guimarães, E.S. Vellozo, Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana, *Semina: Ciências Agrárias* 33 (2012) 687–696.
- [41] E.V. Granowitz, R.B. Brown, Antibiotic adverse reactions and drug interactions, *Crit Care Clin.* 24 (2008) 421–442.
- [42] N.L.F. Pereira, P.E.A. Aquino, E.M. Nascimento, C.D.M. Oliveira, S.R. Tintino, E.G. Figueredo, M.R. Silva, H.N.H. Veras, A.R.S. Grangeiro, I.R.A. Menezes, Efeito antibacteriano e anti-inflamatório tóxico de *Chenopodium ambrosioides* L, *Rev. Fitos.* 9 (2015) 73–159.
- [43] Nanopregados baseados em ciclodextrinas em associação com a tetraciclina: caracterização físico-química e avaliação antimicrobiana, Tese de Mestrado, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.
- [44] E.B. Lucena, S.R. Tintino, E.G. Figueredo, C.D.M. Oliveira, J.J.S. Aguiar, E.A.N. Cardoso, P.E. Aquino, J.C. Andrade, H.D.M. Coutinho, E.F.M. Matias, Avaliação da Atividade Antibacteriana e Moduladora de Aminoglicosídeos do Óleo Essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, *Acta Biol. Colomb.* 20 (2015) 39–45.
- [45] H.D.M. Coutinho, J.G. Costa, E.O. Lima, V.S. Falcão-Silva, J.P. Siqueira-Júnior, In vitro interference of *Hyptis martiusii* Benth & chlorpromazine against an aminoglycoside-resistant *Escherichia coli*, *Indian J. Med. Res.* 129 (2009) 566–568.
- [46] G.F.R. Caldas, A.V. Araújo, G.S. Albuquerque, J.C. Silva-Neto, J.H. Costa-Silva, I.R. A. Menezes, A.C.L. Leite, J.G.M. Costa, A.G. Wanderley, Repeated-doses toxicity study of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth (Lamiaceae) in Swiss Mice, *J. Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2013 (2013) 1–11.
- [47] D.P. Rocha, G.F. Pinto, R. Ruggiero, C.A. Oliveira, W. Guerra, A.P.S. Fontes, T.T. Tavares, I.M. Marzano, E.C. Pereira-Maia, Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana, *Quím. Nova* 34 (2011) 111–118.

6 DISCUSSÃO

6.1 Atividade Antibacteriana Direta

A atividade anti-estafilocócica exibida pelo Óleo Essencial de *Hyptis martiusii* (OEHM) já havia sido demonstrada em trabalho anterior de Coutinho e colaboradores (2008b), porém com o extrato etanólico da espécie.

Os mecanismos pelos quais os óleos essenciais exercem seus efeitos antibacterianos são, provavelmente, diversificados, por apresentarem em sua composição uma ampla variedade de constituintes químicos. Entre esses mecanismos, o dano à membrana celular é o principal mecanismo de ação dos óleos essenciais (CARSON et al., 2002; BURT, 2004; SWAMY; AKHTAR; SINNIHAH, 2016). O aumento da permeabilidade da membrana é uma consequência imediata do efeito danoso, afetando atividades fundamentais para o metabolismo celular bacteriano como nutrição e produção de energia (OUSSALAH; CAILLET; LACROIX, 2006; TROMBETA et al., 2005).

Os principais componentes do OEHM foram os compostos terpenos, tendo como composto majoritário o 1,8-cineol (Monoterpeno). O efeito antimicrobiano dos monoterpenos sobre a membrana ocorre através de uma ação lipofílica sobre os lipídeos que a compõe, provocando desordem das proteínas membranares, alterando suas respectivas funções, bem como alguns componentes acabam por penetrar no citoplasma e afetam alvos intracelulares críticos para o metabolismo bacteriano (VALERIANO et al., 2012; CRISTANI et al., 2007).

Bactérias Gram-positivas são mais sensíveis à ação de óleos essenciais de várias plantas do gênero *Hyptis* (NANTITON; CHOWWANAPHOONPHN; OKONOGLI, 2007; SANTOS et al., 2008), bem como aos compostos terpenos presentes nos óleos essenciais, quando comparadas às Gram-Negativas (ANGIENDA; HILL, 2011).

Em artigo de Cristani et al. (2007), foram testados quatro terpenos (timol, carvacrol, p-cymene e γ -terpineno) contra cepas Gram-positiva (*S. aureus* ATCC 6538P) e Gram-negativa (*E. coli* ATCC 15221), obtendo valores de CIM de 50% a 90% menores na cepa Gram-positiva.

Além da membrana plasmática e da parede celular, as bactérias Gram-negativas possuem uma membrana mais externa, composta principalmente por lipopolissacarídeos (LPS), que forma uma barreira, cuja superfície externa apresenta características hidrofílicas, impedindo a entrada de compostos lipofílicos/hidrofóbicos, tais como os óleos essenciais (VAARA, 1992; HELANDER et al., 1998; BURT, 2004; SIKKEMA et al., 1994). Além da

camada de LPS, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas possuem diferentes composições membranares, gerando uma carga elétrica na superfície da membrana nos referidos microrganismos. Essa carga de superfície protege a bactéria do contato direto com antimicrobianos, então cargas diferentes exercem proteção diferentes, levando a hipótese de que esta diferença de carga explica o melhor efeito antimicrobiano dos monoterpenos sobre as cepas Gram-positivas (CRISTANI et al., 2007; BURT, 2004; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Apesar de todos os efeitos relatados como aumento da solubilidade, melhor aderência à parede celular bacteriana e maior biodisponibilidade do fármaco (TEIXEIRA, 2008), a β -Ciclodextrina (β -CD) sozinha não demonstrou atividade antibacteriana direta, assim como no estudo de Oliveira (2007) sobre a β -CD contra cepas de *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Ensaio utilizando a γ -CD também revelaram nenhum efeito contra cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (HANCI et al., 2014), demonstrando que a CD não possui atividade antibiótica.

Quanto ao composto complexado OEHM/ β -CD, sua falta de atividade antimicrobiana direta corrobora com estudos de Matos-Chamorro et al. (2010) com óleo essencial de orégano encapsulado em β -ciclodextrina, contra leveduras, e com estudo de Guerrero (2006), sobre o óleo essencial das folhas de canela microencapsulado em β -ciclodextrina sobre *Alternaria alternata* e *Botrytis cinerea*.

Porém, estudos com bactérias periodonticas demonstraram que clorexidina complexada com β -Ciclodextrina apresentou melhor atividade antibacteriana do que clorexidina pura, sobre estirpes de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (CORTES et al., 2001).

A complexação de um composto com ciclodextrina implica mudanças estruturais e conformacionais, assim como mudanças de suas propriedades físico-químicas, que podem implicar diretamente sobre as propriedades antimicrobianas. Isso explicaria resultados tão diversos (OLIVEIRA, 2007).

6.2 Efeito Modulador da Atividade Antibiótica

O OEHM demonstrou sinergismo quando em associação com Norfloxacin contra *P. aeruginosa* 15, com uma redução da CIM de 8 para 2 $\mu\text{g/mL}$, e quando associado à gentamicina, o OEHM demonstrou sinergismo contra *E. coli* 06, reduzindo a CIM de 32 a 20,15 $\mu\text{g/mL}$. Resultados semelhantes foram observados no óleo essencial de *Cymbopogon*

citratus, um complexo natural rico em compostos como terpenos que reduziram a CIM de *E. coli* de 156,25 a 39,06 µg/mL (LUCENA et al., 2015).

Este melhor efeito do OEHM sobre cepas Gram-negativas pode ser explicado pela grande quantidade de terpenos no EOEM que melhora o fluxo de antibióticos por alterações na permeabilidade da membrana celular (RIBEIRO et al., 2012). A cadeia de lipopolissacarídeos, presente na membrana mais externa que compõe a estrutura de uma bactéria Gram-negativa, dificulta a ação de antibióticos na membrana (NICOLSON; EVANS; OOTOOLE, 1999). Substâncias apolares (com caráter hidrofóbico) exercem uma ação lipofílica na membrana, afetando diretamente a estrutura do mosaico fluido da mesma, tornando-a mais permeável e instável (GIBBONS, 2004). A permeabilização facilita a entrada de antibióticos (KNOWLES et al., 2005; ARMSTRONG, 2006).

A presença de monoterpenos na mistura garante um caráter lipofílico aos óleos essenciais e essa característica permite a atuação dos óleos essenciais sobre a fração lipídica da membrana plasmática microbiana, tornando-a permeável a prótons e íons maiores (CRISTANI et al., 2007), afetando não apenas sua propriedade de barreira física, mas também processos metabólicos essenciais e comprometendo a produção de energia celular (NICOLSON; EVANS; OOTOOLE, 1999; BURT, 2004).

Essa ação lipofílica dos compostos terpenos sobre a membrana foi estudada por Cristani e colaboradores (2007), testando quatro monoterpenos (timol, carvacrol, p-cymene e γ -terpineno). Através da análise de curvas de entalpia e mudança de temperatura, chegou-se a conclusão que esse mecanismo consiste da substituição de moléculas lipídicas da membrana pelos monoterpenos, fluidificando a membrana no local da ação.

A diferença entre os efeitos modulatórios observados entre as duas cepas Gram-negativas é devido a diferença na composição da camada lipopolissacarídica (LPs) das bactérias analisadas (CAMPEBELL et al., 2007; KURAHASHI et al., 1999, ANDRADE, 2013).

Outros trabalhos que utilizam produtos naturais de *Hyptis martiusii*, como o extrato etanólico, demonstraram sinergismo contra a estirpe *E. coli* 27. Esse fato foi associado à inibição de sistemas de efluxo identificados nesta bactéria pelo uso de clorpromazina (CPZ), causando o mesmo efeito sinérgico (COUTINHO et al., 2009d) e revelando o possível mecanismo de aprimoramento da atividade antibiótica.

A β -CD demonstrou efeito antagonístico diferente quando associado aos antibióticos e contra todas as bactérias testadas. Este efeito antagônico trata-se provavelmente de um

efeito quelante da β -CD com os antibióticos (GRANOWITZ; BROWN, 2008; PEREIRA et al., 2015).

O complexo OEHM/ β -CD demonstrou CIM maiores quando comparado com o OEHM sozinho, demonstrando que a interação com o β -CD afetou o efeito modulador do OEHM.

A ação efetiva de uma substância lipofílica sobre a membrana advém, dentre outros fatores, de sua capacidade de solubilidade na solução (ASHFORD, 2005; ANDRADE, 2013). A presença de hidroxilas na face externa de compostos complexados, tornam suas superfícies hidrofílicas, o que aumentaria a solubilidade dos mesmos, melhorando, teoricamente, seus efeitos antibacterianos (FAHNING; LOBÃO, 2011; LIMA et al., 2016a; ARUN; ASHOK; SRAVANTHI, 2008). Porém, essa nova conformação adquirida pelo complexo, por possibilitar a formação de pontes de hidrogênio com água, aumentou seu caráter hidrofílico, diminuindo sua lipossolubilidade (ASHFORD, 2005), o que pode ter reduzido o efeito da ação lipofílica sobre a membrana (GIBBONS, 2004).

Assim, uma possível explicação para os resultados obtidos, é que as propriedades físico-químicas do complexo de inclusão são diferentes em comparação com os compostos puros, indicando a existência de novas formas ou organização molecular e interação química com sistemas celulares (OLIVEIRA, 2007).

7 CONCLUSÃO

- O Óleo Essencial de *Hyptis martiusii* (OEHM) demonstrou a atividade anti-estafilocócica contra a cepa padrão;
- O OEHM apresentou efeito sinérgico quando associado à Gentamicina e Norfloxacino contra as bactérias Gram-negativas.
- Este óleo essencial é uma fonte potencial de compostos a serem utilizados no tratamento de infecções bacterianas, tanto de forma direta, quanto em associação com antibióticos.
- A atividade antibacteriana observada no OEHM provavelmente foi decorrente da ação do composto majoritário da mistura, o 1,8-Cineol.
- O complexo OEHM/ β -CD e a β -CD sozinho não têm atividade antibacteriana, nem moduladora da atividade antibiótica.
- De acordo com os resultados encontrados, a β -CD não interage diretamente com a bicamada lipídica tal como ocorre com o OEHM sozinho. Devido a este fato, a β -CD não perturba nem afeta a membrana celular.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, U.N. **Análise dos constituintes químicos e avaliação das atividades biológicas do óleo essencial de *Lantana caatingensis* M.; preparo e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri*.** Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.
- AGUIAR, U.N.; S.G. LIMA; ROCHA, M.S.; et al. Preparação e Caracterização do Complexo de Inclusão do Óleo Essencial de *Croton zehntneri* com β -Ciclodextrina. **Química Nova**, v. 37, n.1, p. 50-55, 2014.
- AHARONI, A.; GIRI, A.P.; DEUERLEIN, S.; et al. Terpenoid Metabolism in Wild-Type and Transgenic Arabidopsis Plants. **The Plant Cell**, v. 15, n. 12, p. 2866-2884, 2003.
- AHARONI, A.; JONGSMA, M.A.; KIM, T.; et al. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, p. 49-58, 2006.
- AJA, P.M.; ODEH, C.O.; URAKU, A.J.; et al. Evaluation of Antioxidant Activities of Ethanol Leaf Extracts of *Cymbopogon citratus* and *Hyptis spicigera* in Mice Exposed to *Plasmodium berghei*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 2, p. 382-393, 2015.
- AKÇIN, Ö.E.; ÖZYURT, M.S.; ŞENEL, G. Petiole anatomy of some Lamiaceae taxa. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, n.3, p. 1437-1443, 2011.
- AKPAKA, P.E.; SUE-HO; BODONAIK, N.C. Frequency of occurrence and antibiotic resistance in bacteria isolated from patients in the Intensive Care Unit. **West Indian Medical Journal**, v. 51 (Suppl. 3), p. 17, 2002.
- ALMEIDA, C.F.C.B.R.; ALBUQUERQUE, U.P. Check-list of the Family Lamiaceae in Pernambuco, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n.3, p. 343-353, 2002.
- ALMEIDA, G.D.; GODOI, E.P.; SANTOS, E.C.; et al. Extrato aquoso de *Allium sativum* potencializa a ação dos antibióticos vancomicina, gentamicina e tetraciclina frente *Staphylococcus aureus*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 4, p. 487-492, 2013.
- ALVES, L.A.; FREIRES, I.A.; CASTRO, R.D. Efeito Antibacteriano de Óleos Essenciais sobre Bactérias Formadoras do Biofilme Dentário. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, p. 57-62, 2010.
- AMARAL, J.F.D. **Atividade antiinflamatória, antinociceptiva, e gastroprotetora do óleo essencial de *croton sonderianus muell. arg.*** Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.
- ANDRADE, J.C. **Avaliação In Vitro do potencial modulador das vitaminas lipossolúveis colecalciferol, alfa-tocoferol e menadiona.** Dissertação de Mestrado - Universidade Regional do Cariri, Crato. 2013.

ANJOS, K.S.; ARAÚJO-FILHO, H.G.; DUARTE, M.C.; et al. HPLC-DAD analysis, antinociceptive and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract of *Hyptis umbrosa* in mice. **EXCLI journal**, v. 16, p. 14-24, 2017.

ANTIKOLINESTERAZ, A.H.T.P.; BITKILERI, B.K.O.L.F. Lamiaceae family plants as a potential anticholinesterase source in the treatment of Alzheimer's disease. **Bezmialem Science**, v. 1, p. 1-25, 2014.

ARAÚJO, E.C.C.; UCHOA, D.E.A.; SILVEIRA, E.R. Structure Determination of New Abietane Diterpenes from *Hyptis martiusii* by NMR Analysis. **Annals of Magnetic Resonance**, v. 2, n. 3, p. 119-121, 2003.

ARAÚJO, E.C.C.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; et al. Insecticidal Activity and Chemical Composition of Volatile Oils from *Hyptis martiusii* Benth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3760-3762, 2003.

ARAÚJO, E.C.C.; LIMA, M.A.S.; SILVEIRA, E.R. Spectral assignments of new diterpenes from *Hyptis martiusii* Benth. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 42, p. 1049–1052, 2004.

ARAÚJO, E.C.C.; LIMA, M.A.S.; MONTENEGRO, R.C.; Cytotoxic Abietane Diterpenes from *Hyptis martiusii* Benth. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 61, n. 3-4, p. 177-183, 2006.

ARAÚJO, J.C.L.V.; LIMA, E.O.; CEBALLOS, B.S.O.; et al. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 33, n. 1, p. 55-64, 2008.

ARAÚJO, A.J.; MARINHO FILHO, J.D.B.; LIMA, K.S.B.; et al. Abietane Diterpene Isolated from *Hyptis Carvalhoi* Harley (Lamiaceae) Induces Cell Death by Autophagy and Apoptosis. **Planta Medica**, v. 79, n. 10, PE1, 2013.

ARMSTRONG, J.S. Mitochondria: a target for câncer therapy. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 239-248, 2006.

ARUN, R.; ASHOK, K.C.K.; SRAVANTHI, et al. Cyclodextrins as Drug Carrier Molecule: A Review. **Scientia Pharmaceutica**, v. 76, p. 567–598, 2008.

ASHFORD, M. Biodisponibilidade – Fatores Físico-Químicos relacionados à forma farmacêutica. In: Aulton, M.E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Cap.17, 245-263.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; et al. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BARBOSA, A.G.R.; OLIVEIRA, C.D.M.; LACERDA-NETO, L.J.; et al. Evaluation of chemical composition and antiedematogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 2, p. 355-361, 2017.

BATISTA, J. A.; BOTREL, P. P.; FIGUEIREDO, F. C. Efeito do Extrato de Tiririca e Bioestimulante no Enraizamento de Estacas de *Hyptis marruboides* Epl. **Revista Agrogeoambiental**, v. 7, n. 2, p. 91-99, 2015.

BLAIR, J.M.A.; WEBBER, M.A.; BAYLAY, A.J.; et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**. 2014.

BOLDRINI, F. **Obtenção e caracterização do complexo molecular Hidroquinona/Beta-Ciclodextrinas e estudo do uso dermatológico**. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista Julio de mesquita Filho, São Paulo, 2005.

BORGES, C.H.G.; SOUZA, J.; VENEZIANE, R.; et al. Atividade de Derivados Semi-Sintéticos do Ácido Caurenóico Contra Leishmania amazonenses. **Investigação**, v. 15, n. 6, 2016.

BOSS, R.; OVERESCH, G.; BAUMGARTNER, A. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli*, Enterococci, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* from Raw Fish and Seafood Imported into Switzerland. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 7, p. 1240-1246, 2016.

BRANQUINHO, N.A.A. **Avaliação de teor e composição química dos óleos essenciais de três espécies de Hyptis, submetidas a diferentes velocidades e temperaturas de secagem**. Dissertação de Mestrado – Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2015.

BRITO, R.G.; ARAUJO, A.A.; QUINTANS, J.S.; et al. Enhanced analgesic activity by cyclodextrins - a systematic review and meta-analysis. **Expert Opin Drug Deliv**, p. 1-12, 2015.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CALDAS, G.F.R.; DO AMARAL COSTA, I.M.; DA SILVA, J.B.R.; et al. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 886–892, 2011.

CALDAS, G.F.R.; ARAÚJO, A.V.; ALBUQUERQUE, G.S.; et al. Repeated-Doses Toxicity Study of the Essential Oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae) in Swiss Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

CALDAS, G.F.R.; OLIVEIRA, A.R.S.; ARAÚJO, A.V.; et al. Gastroprotective and Ulcer Healing Effects of Essential Oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae). **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

CAMPEBELL, R.C; PEIRÓ, J.R.; ROSA , P.C.S.; et al. Endotoxemia por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, em eqüinos: efeitos de antiinflamatórios nas concentrações sérica e peritoneal do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 4, p. 837-843, 2007.

CASANOVA, F.; SANTOS, L. Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application. **Journal of Microencapsulation**, v. 33, n. 1, p. 1-17, 2015.

CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; et al. Cyclodextrin in drug delivery: an updated review. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 6, n. 2, p. 329–357, 2005.

CHANDA, S.; RAKHOLIYA, K. Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. In: A. Méndez-Vilas. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Badajoz: **Formatex**, 2011. 520-529.

CHANDA, S.; DUDHATRA, S.; KANERIA, M. Antioxidative and antibacterial effects of seeds and fruit rind of nutraceutical plants belonging to the family Fabaceae family. **Food and Function**, v. 1, p. 308-315, 2010.

CHEPULIS, L.M.; FRANCIS, E. An initial investigation into the anti-inflammatory activity and antioxidant capacity of alpha-cyclodextrin-complexed Manuka honey. **Journal of Complementary & Integrative Medicine**, v. 9, 2012.

CHIERENTIN, L. **Análise Químico-Farmacêutica de Norfloxacinó comprimidos e estudos de complexação com β -Ciclodextrina e Polimorfismo**. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista, São Paulo. 2013.

CHUNG, P. Y.; NAVARATNAM, P.; CHUNG, L. Y. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 10, n. 25, p. 25-31, 2011.

CLERMONT, O.; COUFFIGNAL, C.; BLANCO, J.; et al. Two levels of specialization in bacteraemic *Escherichia coli* strains revealed by their comparison with commensal strains. **Epidemiology and Infection**, p. 1-11, 2016.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 8th ed. CLSI; 2008.

CONCEIÇÃO, T.; COELHO, C.; DE LENCASTRE, H.; et al. Prevalence of biocide resistance determinants in *Staphylococcus aureus* isolates from three African countries. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, p. 678–681, 2016.

CORTÉS, M.E.; SINISTERRA, R.D.; ÁVILA-CAMPOS, M.J.; et al. The Chlorhexidine: beta-Cyclodextrin Inclusion Compound: Preparation, Characterization and Microbiological Evaluation. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 40, p. 297–302, 2001.

COSTA-LOTUFO, L.V.; ARAÚJO, E.C.C.; LIMA, M.A.S.; et al. Antiproliferative effects of abietane diterpenoids isolated from *Hyptis martiusii* Benth (Labiatae). **Pharmazie**, v. 58, p. 78–79, 2004.

COSTA, J.G.M.; RODRIGUES, F.F.G.; ANGÉLICO, E.C.; et al. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O.; et al. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, p. 328-330, 2008a.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; et al. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 670-675, 2008b.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O.; et al. Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 1-4, 2009a.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O.; et al. *In vitro* interference of *Momordica charantia* and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, n. 11, p. 1056-1059, 2009b.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O.; et al. *In vitro* phototoxic activity of *Eugenia jambolana* L. and *Hyptis martiusii* Benth. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 96, p. 63-65, 2009c.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O.; et al. *In vitro* interference of *Hyptis martiusii* Benth. & chlorpromazine against an aminoglycoside - resistant *Escherichia coli*. **Indian Journal of Medical Research**, v. 129, n. 566-568, 2009d.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O.; et al. Additive effects of *Hyptis martiusii* Benth with aminoglycosides against *Escherichia coli*. **Indian Journal of Medical Research**, v. 131, p. 106-108, 2010a.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; FALCÃO-SILVA, V.S.; et al. *In vitro* additive effect of *Hyptis martiusii* in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 9, p. 1002–1006, 2010b.

CRISTANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; et al. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n.15, p. 6300-6308, 2007.

CROSBY, H.A.; SCHLIEVERT, P.M.; MERRIMAN, J.A.; et al. The *Staphylococcus aureus* Global Regulator MgrA Modulates Clumping and Virulence by Controlling Surface Protein Expression. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 5, 2016.

CUNHA-FILHO, M.S.S.; SÁ-BARRETO, L.C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2007.

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. **Crop Protection Journal**, v. 22, n. 1, p. 39-44, 2003.

DAVIS, R.; BROWN, P.D. Multiple antibiotic resistance index, fitness and virulence potential in respiratory *Pseudomonas aeruginosa* from Jamaica. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, p. 261-271, 2016.

DORMAN H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308-316, 2000.

DRUNKLER, D.A.; FETT, R.; LUIZ, M.T.B. Polímeros de Ciclodextrina: Características, Formação de Complexos de Inclusão e Aplicações Industriais. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 17, n. 1, p. 21-32, 1999.

FAHNING, B.M.; LOBÃO, E.B. **Nanotecnologia Aplicada a Fármacos**. Monografia de Graduação - Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo, Espírito Santo, 2011.

FALCÃO, R.E.A.; SOUZA, S.A.; CAMARA, C.A.; et al. Evaluation of the orofacial antinociceptive profile of the ethyl acetate fraction and its major constituent, rosmarinic acid, from the leaves of *Hyptis pectinata* on rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 2, p. 203-208, 2016.

FINAN, J.E.; ROSATO, A.E.; DICKINSON, T.M.; et al. Conversion of oxacillin resistant *Staphylococci* from heterotypic to homotypic resistance expression. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 24-30, 2001.

FLORES-MIRELES, A.L.; WALKER, J.N.; CAPARON, M.; et al. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 269-284, 2015.

FITZGERALD, J.R. Evolution of *Staphylococcus aureus* during human colonization and infection. **Infections Genetic Evolution**, v. 21, p. 542-547, 2014.

FOXMAN, B. The epidemiology of urinary tract infection. **Nature Reviews Urology**, v. 7, n. 12, p. 653-660, 2010.

FRIDKIN, S.K.; HAGEMAN, J.C.; MORRISON, M.; et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 14, p. 1436-1444, 2005.

FLORES, M.; ROJAS, L.; APARICIO, R.; et al. Essential Oil Composition and Antibacterial Activity of *Hyptis colombiana* from the Venezuelan Andes. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 10, p. 1751-1752, 2015.

FROST, L.S.; LEPLAE, R.; SUMMERS, A.O.; et al. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 722-732, 2005.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R.A.C.; MACHADO, M.F.P.S.; et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GALICE, D.M.; BONACORSI, C.; SOARES, V.C.G.; et al. Effect of subinhibitory concentration of chlorhexidine on *Streptococcus agalactiae* virulence factor expression. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 28, p. 143-146, 2006.

GALLUCCI, M.N.; OLIVA, M.; CASERO, C.; et al. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 24, p. 348-354, 2009.

GBIF – Global Biodiversity Information Facility. *Hyptis martiusii* Benth. GBIF Secretariat: GBIF Backbone Taxonomy. 2016.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural product reports**, v. 126, p. 263-277, 2004.

GIDWANI, B.; VYAS, A. Synthesis, Characterization and application of Epichlorohydrin-Beta-Cyclodextrin polymer. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 114, p. 130-137, 2014.

GONZÁLEZ, M.A. Aromatic abietane diterpenoids: their biological activity and synthesis (Review Article). **Natural Products Report**, v. 32, p. 684-704, 2015

GONZÁLEZ-LAMOTHE, R.; MITCHELL, G.; GATTUSO, M.; et al. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 8, p. 3400-3419, 2009.

GRANOWITZ, E.V.; BROWN, R.B. Antibiotic adverse reactions and drug interactions. **Critical Care Clinics**, v. 24, p. 421-442, 2008.

GUEDES, F.L.; ALVES, G.M.C.; SANTOS, F.L.A.; et al. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 8, n. 92, p. 220-235, 2008.

GUERRERO, S.A.N. **Evaluación del efecto antifúngico *In Vitro* del aceite esencial de hoja de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) puro y microencapsulado**. Monografía de Graduação - Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, Honduras. 2006.

HAIPOUR, M.J. ET AL. Antibacterial properties of nanoparticles. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 499-511, 2012.

HALL, B.M.; BREIDENSTEIN, E.B.M.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; et al. Two isoforms of Clp peptidase in *Pseudomonas aeruginosa* control distinct aspects of cellular physiology. **Journal of Bacteriology**, 2017.

HANCI, V.; VURAL, A.; HANCI, S.Y.; et al. Avaliação in vitro das características antimicrobiais da sugamadez. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 64, p. 105-108, 2014.

HANLIDOU, E.; KOKKINI, S.; BOSABALIDIS, A.M.; et al. Glandular trichomes and essential oil constituents of *Calamintha menthifolia* (Lamiaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 177, n. 1-2, p. 17-26, 1991

HIROSE, K. A practical guide for the determination of binding constants. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 39, p. 193–209, 2001.

HOMEM, I.C.M. **Estudos fitoquímicos, ensaios de toxicidade, atividade larvicida, antimicrobiana e antioxidante das folhas e caules de *Mollinedia clavigera* Tul. (Monimiaceae)**. Dissertação de mestrado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

HUSSEIN, H.A. Taxonomical and phylogenetic implications of nutlet morphology in some members of subfamily Boraginoideae (Family, Boraginaceae). **J. Union Arab Biol**, v. 10, p. 41-52, 2000.

IVOKE, N.; OKAFOR, F.C.; OWOICHO, L.O. Evaluation Of Ovicidal And Larvicidal Effects Of Leaf Extracts Of *Hyptis suaveolens* (L) Poit (Lamiaceae) Against *Anopheles gambiae* (DIPTERA: ANOPHELIDAE) Complex. **Animal Research International**, v. 6, n. 3, p. 1072–1076, 2009.

JAGDALE, S.C.; JADHAV, V.N.; CHABUKSWAR, A.R.; et al. Solubility enhancement, physicochemical characterization and formulation of fast-dissolving tablet of nifedipine-betacyclodextrin complexes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 1, 2012.

JORGENSEN, J.H.; FERRARO, M.J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 1749–1755, 2009.

JUG, M.; BEĆIREVIĆ-LAĆAN, M.; BEÆIREVIÆ-LAÆAN, M. Cyclodextrin-based pharmaceuticals. **Medical Radiation Science**, v. 499, p. 9-26, 2008.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–40, 2004.

KENNEDY, G.L., FERENZ, R.L., BURGESS, B.A. Estimation of acute oral toxicity in rats by determination of the approximate lethal dose rather than the LD50. **Journal of Applied Toxicology**, v. 6, p. 145–148, 1986.

KERDUDO, A.; NJOH ELLONG, E.; GONNOT, V.; et al. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Hyptis atrorubens* Poit. from Martinique (F.W.I.). **Journal of Essential Oil Research**, p. 1-9, 2016.

KEW, Royal Botanic Gardens. **Herbarium Catalogue** – *Hyptis martiusii*. Publicado em: <http://apps.kew.org/herbcat/getHomePageResults.do?homePageSearchText=Hyptis+martiusii>. Citado em: 20/01/2017.

KLEVENS, R.M.; MORRISON, M.A.; NADLE, J.; et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. **Journal of the American Medical Association**, v. 298, p. 1763–1771. 2007.

KNOWLES, J. R.; ROLLER, S.; MURRAY, D. B.; et al. Antimicrobial Action of Carvacrol at Different Stages of Dual-Species Biofilm Development by *Staphylococcus aureus* and

Salmonella enterica Serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 797–803, 2005.

KOONIN, E.V.; WOLF, Y.I. Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. 6688–6719, 2008.

KOTHANDAN, S.; SWAMINATHAN, R. Evaluation of in vitro antiviral activity of *Vitex Negundo* L., *Hyptis suaveolens* (L) poit., *Decalepis hamiltonii* Wight & Arn., to Chikungunya virus. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, p. S111-S115, 2014.

KROEFF, V.N.; JUNG, D.H.; GROFF, G.; et al. Morfologia Polínica de *Hyptis* Jacq. (Lamiaceae) no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, v. 1, 2002.

KURAHASHI, K.; KAJIKAWA, O.; SAWA, T.; et al. Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n. 6, p. 743-50, 1999.

LANDMAN, D.; BRATU, S.; KOCHAR, S.; et al. Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 78–82, 2007.

LEITE, N.F.; SOBRAL-SOUZA, C.E.; ALBUQUERQUE, R.S.; et al. Atividade antiparasitária in vitro e citotóxica de cariofileno e eugenol contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 4, p. 522-528, 2013.

LELAND J.C.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P.B.; et al. Natural products from plants. Boca Raton: CRC, 2006.

LESCAT, M.; LAUNAY, A.; GHALAYINI, M.; et al. Using long-term experimental evolution to uncover the patterns and determinants of molecular evolution of an *Escherichia coli* natural isolate in the streptomycin-treated mouse gut. **Molecular Ecology**, 2016.

LIMA, P.S.S.; LUCCHESI, A.M.; ARAÚJO-FILHO, H.G.; et al. Inclusion of Terpenes in Cyclodextrins: Preparation, Characterization and Pharmacological Approaches. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 965-987, 2016a.

LIMA, V.N.; OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.; SANTOS, E.S.; et al. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. **Microbial Pathogenesis**, 99, 56-61, 2016b.

LIU, L.; GUO, Q.X. The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins. **Journal of Inclusion Phenomena Macrocyclic Chemistry**, 42, 1–14, 2002.

LOFTSSON, T.; SIGFUSSON, S.D.; SIGUROSSON, H.H.; et al. The Effects of cyclodextrins on topical delivery of Hydrocortisone: the aqueous diffusion layer. **STP Pharma Science**, v. 13, p. 125–131, 2003.

LUCENA, F.B.; TINTINO, S.R.; FIGUEREDO, F.G.; et al. Avaliação da Atividade Antibacteriana e Moduladora de Aminoglicosídeos do Óleo Essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) **Acta biológica Colombiana**, v. 20, p. 39-45, 2015.

LYRA, M.A.M.; ALVES, L.D.S.; FONTES, D. A. F.; et al. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacológica Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 117-124, 2010.

MAIA, J.L. **Estudo da Atividade Antinociceptiva e Possíveis Mecanismos de Ação do Ácido Oleanólico em Modelos de Nociceção Induzida por Capsaicina e Óleo de Mostarda em Camundongos**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

MANAKKER, F.; VERMONDEN, T.; VANS NOSTRUM, C.F.; et al. Cyclodextrin-based polymeric materials: synthesis, properties, and pharmaceutical/biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 3157–3174, 2009.

MATOS, B.M.; KOMIYAMA, E.Y.; BALDUCCI, I.; et al. Antifungal activity of Mentha piperita alcoholic extract on Candida albicans and C. tropicalis. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 38, n. 4, p. 244-248, 2009.

MATOS-CHAMORRO, A.; QUISPE-CONDORI, S.; QUITO-VIDAL, M.R.; et al. Evaluación de la Capacidad Antimicrobiana del Aceite Esencial de Orégano (*Origanum vulgare*) Microencapsuladas en β -ciclodextrina Aplicados en Cultivos Microbianos. **Revista ciência e tecnologia de alimentos**, v. 1, n. 1, 2010.

MAURA, D.; HAZAN, R.; KITAO, T.; et al. Evidence for Direct Control of Virulence and Defense Gene Circuits by the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Regulator, MvfR. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

MEDRADO, H.H.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; et al. Distribution, biological activities, synthesis, and purification methods for podophyllotoxin and its derivatives. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 243-258, 2015

MENEZES, P.P.; ARAUJO, A.S.A.; DORIA, A.A.G.; et al. Physicochemical Characterization and Analgesic Effect of Inclusion Complexes of Essential Oil from *Hyptis pectinata* L. Poit Leaves with β -Cyclodextrin. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 440-450, 2015.

MENEZES, P.P. **Obtenção e caracterização físico-química de complexos supramoleculares de óleo essencial e substância isolada em ciclodextrina**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2015.

MOREIRA, A.C.P.; LIMA, E.O.; WANDERLEY, P.A.; et al. Chemical composition and antifungal activity of Hyptis suaveolens (L.) poit leaves essential oil against Aspergillus species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 28-33, 2010.

MUELLER, M.; ČAVARKAPA, A.; UNGER, F.M.; et al. Prebiotic potential of neutral oligo- and polysaccharides from seed mucilage of *Hyptis suaveolens*. **Food Chemistry**, v. 221, p. 508-514, 2017.

NADER, T.T.; COPPEDE, J.S.; AMARAL, L.A.; et al. Atividade Antibiofilme de Diterpeno Isolado de *Croton antisiphiliticus* frente *Staphylococcus aureus*. **Ars Veterinaria**, v. 30, n. 1, p. 032-037, 2014.

NANTITON, W.; CHOWWANAPHOONPOHN, S.; OKONOGLI, S. Antioxidant and antimicrobial activities of Hyptos suaveolens essential oil. **Scientia Pharmaceutica**, v. 75, n. 35, 2007.

NASCIMENTO, P.F.C.; NASCIMENTO, A.C.; RODRIGUES, C.S.; et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

NCUBE, B.; FINNIE, J.F.; STADEN, J.V. *In vitro* antimicrobial synergism within plant extract combinations from three South African medicinal bulbs. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 81 – 89, 2012.

NGUYEN, D.P.; NGUYEN, T.A.D.; LE, T.H.; et al. Dissemination of Extended-Spectrum β -Lactamase- and AmpC β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* within the Food Distribution System of Ho Chi Minh City, Vietnam. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 9, 2016.

NICOLSON, K.; EVANS, G.; OOTOOLE, P.W. Potentiation of methicillin. Activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. **FEMS microbiology Letters**, v. 179, p. 233–239, 1999.

NOSTRO, A.; BLANCO, A.R.; CANNATELLI, M.A.; et al. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, p. 191–195, 2004.

OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; VIEIRA, W.L.; et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 77-82, 2006.

OLIVEIRA, H.F.D. **Nanoagregados baseados em ciclodextrinas em associação com a tetraciclina: caracterização físico-química e avaliação antimicrobiana**. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Odontologia da UFMG, Belo Horizonte, 2007.

OLIVEIRA, V.E.; ALMEIDA, E.W.C.; CASTRO, H.V.; et al. Carotenoids and β -Cyclodextrin Inclusion Complexes: Raman Spectroscopy and Theoretical Investigation. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 115, p. 8511-8519, 2011.

OLIVEIRA, J.D.; ALVES, C.C.F.; MIRANDA, M.L.D.; et al. Rendimento, composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas de *Campomanesia adamantium* submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 502-510, 2016.

OLIVEIRA, D.R. **Avaliação da Atividade Tipo Antidepressiva do Óleo Essencial das Folhas de *Spiranthera odoratissima* A. ST.-HIL. e de Seu Componente Majoritário, B-Cariofileno**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

OLIVEIRA, A.D.L.; RODRIGUE, F.F.G.; COUTINHO, H.D.M.; et al. Chemical Composition, Modulatory Bacterial Resistance and Antimicrobial Activity of Essential Oil the *Hyptis martiusii* Benth by Direct and Gaseous Contact. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, v. 9, n. 3, 2014.

OLIVEIRA, B.F. **Influência de um Complexo Vitamínico (Ácido Ascórbico, Alfa-Tocoferol E Beta-Caroteno) no Estresse Oxidativo de Células Mononucleares de Indivíduos não Diabéticos e Diabéticos Tipo 1**. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 2014.

OLOWOKUDEJO, J.D. Taxonomic value of petiole anatomy in the genus *Biscutella* L. (Cruciferae). **Bulletin du Jardin Botanique National Belgique**, v. 57, p. 307-320, 1987.

OMS – Organização Mundial de Saúde. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. WHO Library Cataloguing-in-Publication, 2014.

PATROČKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine Signification. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 1, p. 7-12, 2003.

PEREIRA, R.; CARDOSO, M. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PEREIRA, N.L.F.; AQUINO, P.E.A.; SILVA, M.R.; et al. Efeito antibacteriano e anti-inflamatório tópico de *Chenopodium ambrosioides* L. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 9, n. 2, p. 101-112, 2015.

PERRY, E.; HOWES, M.J.R. Medicinal plants and dementia therapy: herbal hopes for brain aging? **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 17, n. 6, p. 683-698, 2011.

PINHEIRO, M.A.; MAGALHÃES, R.M.; TORRES, D.M.; et al. Gastroprotective effect of alpha-pinene and its correlation with antiulcerogenic activity of essential oils obtained from *Hyptis* species. **Pharmacognosy magazine**, v. 11, n. 41, p. 123-130, 2015.

PINHO, E.; GROOTVELD, M.; SOARES, G.M.B.; et al. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 30, p. 121-135, 2013.

PINHO, E.; SOARES, G.; HENRIQUES, M.J. Cyclodextrin modulation of gallic acid in vitro antibacterial activity. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 81, n. 1, p. 205-214, 2015.

RAJEWSKI, R.A.; STELLA, V.J. Pharmaceutical Application of cyclodextrins. In vivo drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 11, p. 1142-69, 1996.

RAMOS, M.A. **Constituintes químicos e avaliação das atividades biológicas do óleo essencial de *Hyptis spicigera* (Lamiaceae) e do seu complexo de inclusão em β -ciclodextrina**. Dissertação de mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

RANDALL, C.P.; MARINER, K.R.; CHOPRA, I.; et al. The target of daptomycin is absent from *Escherichia coli* and other Gram-negative pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, p. 637–639, 2013.

RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

REIS, C.F. **Efeitos vasculares do oleorresina de *Pterodon* spp. Vogel (Fabaceae) e do seu diterpeno isolado (6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila)**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

ROCHA LQ. **Interferência do óleo essencial de folhas do quimiotipo II de *Lippia alba* (MILL.) NE BROWN na atividade antimicrobiana da oxacilina sobre *staphylococcus aureus* oxacilina-resistente**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

ROZZA, A.L.; PELLIZZON, C.H. Essential oils from medicinal and aromatic plants: a review of the gastroprotective and ulcer-healing activities. **Fundamental & clinical Pharmacology**, v. 27, n. 1, p. 51-63, 2013.

RIBEIRO, D.S.; MELO, D.B.; GUIMARÃES, A.G.; et al. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, p. 687-696, 2012.

RIOU, M.; AVRAINB, L.; CARBONNELLEA, S.; et al. Increase of efflux-mediated resistance in *Pseudomonas aeruginosa* during antibiotic treatment in patients suffering from nosocomial pneumonia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 47, n. 1, p. 77-83, 2016.

SALES, G.W.P.; BATISTA, A.H.M.; ROCHA, L.Q.; et al. Efeito antimicrobiano e modulador do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courbaril* L. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 4, p. 709-715, 2014.

SALÚSTIO, P.J.; PONTES, P.; CONDUTO, C.; et al. Advanced technologies for oral controlled release: cyclodextrins for oral controlled release. **AAPS PharmSciTech**. v. 12, n. 4, p. 1276-1292, 2011.

SANTOS, P.O.; COSTA, M.D.J.C.; ALVES, J.A.B.; et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis pectinata*, Poit. **Química Nova**, v. 31, p. 1648- 1652, 2008.

SANTOS, R.A.F. **Avaliação das Propriedades Biológicas dos Derivados Sintéticos do B-Sitosterol e Triterpenos**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

SANTOS, A.K.L.; COSTA, J.G.M.; MENEZES, I.R.A.; et al. Antioxidant activity of five Brazilian plants used as traditional medicines and food in Brazil. **Pharmacognosy Magazine**, v. 6, n. 24, p. 335-338, 2010.

SANTOS, K.K.A.; MATIAS, E.F.F.; SOBRAL-SOUZA, C.E.; et al. Trypanocide, cytotoxic, and anti-*Candida* activities of natural products: *Hyptis martiusii* Benth. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 5, p. 427–431, 2013.

SANTOS, S.N.; CASTANHA, R.F.; SILVA, L.J.; et al. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Hyptis leucocephala*. **Atas de Saúde Ambiental**, v. 3, n. 1, p. 3-11, 2015.

SCHWARTBECK, B.; BIRTEL, J.; TREFFON, J.; et al. Dynamic *in vivo* mutations within the *ica* operon during persistence of *Staphylococcus aureus* in the airways of cystic fibrosis patients. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 11, 2016.

SHENOY, C.; PATIL, M.B.; KUMAR, R. Wound healing activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae). **International Journal of PharmTech Research**, v. 1, n. 3, p. 737-744, 2009.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**. v. 59, n. 2, p. 201-222, 1995.

SILVA, M.S.P.; BRANDÃO, D.O.; CHAVES, T.P.; et al. Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid Northeast: Contribution to the controlo f oral microorganisms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, n. 2, p. 1-6, 2012.

SILVA, K.M.A., CHAVES, T.P., SANTOS, R.L., et al. Modulation of the erythromycin resistance in *Staphylococcus aureus* by ethanolic extracts of *Ximenesia americana* L. and *Schinopsis brasiliensis*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe**, v. 14, p. 92–98, 2015.

SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L. Constituintes micromoleculares de plantas do nordeste com potencial farmacológico com dados de RMN 13C. Fortaleza: Expressão Gráfica e Editora, 2005.

SILVEIRA, G.P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; et al. Estratégias Utilizadas no Combate a Resistência Bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Florianópolis: Editora da UFSC, 1102p. 2007.

SIQUEIRA-LIMA, P.S.; ARAUJO, A.A.S.; LUCCHESI, A.M.; et al. b-Cyclodextrin Complex Containing *Lippia grata* Leaf Essential Oil Reduces Orofacial Nociception in Mice – Evidence of Possible Involvement of Descending Inhibitory Pain Modulation Pathway. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 114, p. 188–196, 2014.

SMATI, M.; CLERMONT, O.; LE GAL, F.; et al. Real-Time PCR for Quantitative Analysis of Human Commensal *Escherichia coli* Populations Reveals a High Frequency of Subdominant Phylogroups. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 16, p. 5005–5012, 2013.

SONG, L.X.; BAI, L.; XU, X.M.; et al. Inclusion complexation, encapsulation interaction and inclusion number in cyclodextrin chemistry. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, n. 9–10, p. 1276–1284, 2009.

SOUSA, L.U.; MIELKE, T.P.; HOMER, R.; et al. Avaliação de metodologias para a detecção de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) e análise do perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos em um hospital terciário. **Revista Saúde**, v. 37, n. 1, p. 23-30, 2011.

STELLA, V.; RAO, V.; ZANNOU, E; et al. Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, n. 1, p. 3-16, 1999.

STOVER, C.K.; PHAM, X.Q.; ERWIN, A.L.; et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, p. 959-964, 2000.

SZENTE, L; SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, p. 137-142, 2003.

TANG, L.; LI, X.F.; YANG, S.X.; et al. Chemical constituents of *Hyptis rhomboidea* and their antifungal activity. **Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica**, v. 39, n. 12, p. 2284-2288, 2014.

TEIXEIRA, K.I.R. **Estudo das alterações da membrana celular de microorganismos por compostos de inclusão de clorexidrina: Beta-ciclodextrina em diferentes proporções molares usando microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura.** Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2008.

TENAILLON, O.; SKURNIK, D.; PICARD, B.; et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 207 –217, 2010.

THE PLANT LIST. Version 1.1. Published on the Internet; 2013. <http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st January).

TINTINO, S.R.; GUEDES, G.M.M.; CUNHA, F.A.B.; et al. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity and modulating the ethanol and hexane extracts of *Costus arabicus* bulb. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 3, p. 732-738, 2013.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R; CASE, C.L. *Microbiologia*– 10. ed. Porto Alegre :Artmed, 2012.

TOURRET, J.; WILLING, B.P.; CROXEN, M.A.; et al. Small Intestine Early Innate Immunity Response during Intestinal Colonization by *Escherichia coli* Depends on Its Extra-Intestinal Virulence Status. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, 2016.

TURINA ADEL, V.; NOLAN, M. V.; ZYGADLO, J. A.; et al. Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v. 122, p. 101-113, 2006.

TURNER, A. Terpenoids and steroids. In: ----- . Annual Reports Prog. Chemistry, Section B: Organic Chemistry. v. 109, n. 1-2, p. 389-422, 2013.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin drug carrier systems. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 2045–2076, 1998.

UEKAMA K. Design and evaluation of cyclodextrin based drug formulation. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 8, p. 900–915, 2004.

ULUBELEN, A.; TOPCU, G.; KOLAK, U. Labiatae flavonoids and their bioactivity. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 30, p. 233-302, 2005.

URAKU, A.J.; OKAKA, A.N.C.; IBIAM, U.A.; et al. Antiplasmodial Activity of Ethanolic Leaf Extracts of *Spilanthes uliginosa*, *Ocimum basilicum* (Sweet Basil), *Hyptis spicigera* and *Cymbopogon citratus* on Mice Exposed to *Plasmodium berghei* Nk 65. **International Journal of Biochemistry Research & Review**, v. 6, n. 1, p. 28-36, 2015.

VAARA, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane, **Microbiological Reviews**, v. 56, p. 395–411, 1992.

VALERIANO, C.; PICCOLI, R.H.; CARDOSO, M.G.; et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 57-67, 2012.

VAZ, R.; SOUSA, A.; LOPES, S.P.; et al. Microaerophilic growth characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* importance to the successful treatment of chronic infections in cystic fibrosis lungs. *Biofilms 7 - Microbial Works of Art*. No. P3: 25, Porto, Portugal, June 26-28, 2016. ISBN: 978-989-97478-7-6.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2, p. 97-110, 2009.

WERKER, E. Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of Lamiaceae a review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 8, n. 5, p. 249-255, 2006.

WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N.; PASCHALL, E.F. Starch chemistry and technology. 2.ed. Florida : Academic Press, 1984. p. 143-149.

ZHU, L.; LIN, J.; MA, J.; et al. Triclosan resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is due to FabV, a triclosan-resistant enoyl-acyl carrier protein reductase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 689–698, 2010.

ANEXO A: PRODUÇÕES CIENTÍFICAS

Resumos Publicados em Anais de Congressos:

COSTA, M.S.; FREITAS, T.S.; SILVA, A.R.P.; et al. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E POTENCIALIZADORA DE ANTIBIÓTICOS DO DLIMONENO COMPLEXADOS COM β -CICLODEXTRINA CONTRA BACTÉRIAS PADRÕES E MULTIRRESISTENTE.. In: XIX Semana de Iniciação Científica da URCA, 2016, Crato - CE. II Semana Universitária da URCA / XIX Semana de Iniciação Científica da URCA. Crato, Ceara: Universidade Regional do Cariri (URCA), 2016.

PEREIRA, R. L. S.; CAMPINA, F. F.; FREITAS, T.S.; et al. INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DO CITRONELOL FRENTE A CEPAS MULTIRRESISTENTES. In: XIX Semana de Iniciação Científica da URCA, 2016, Crato - CE. II Semana Universitária da URCA / XIX Semana de Iniciação Científica da URCA. Crato, Ceara: Universidade Regional do Cariri (URCA), 2016.

SILVA, A.R.P.; COSTA, M.S.; FREITAS, T.S.; et al. ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO D-LIMONENO EM BACTÉRIAS PADRÕES E MULTIRESISTENTES. In: XIX Semana de Iniciação Científica da URCA, 2016, Crato - CE. II Semana Universitária da URCA / XIX Semana de Iniciação Científica da URCA. Crato - CE: Universidade Regional do Cariri (URCA), 2016.

SILVEIRA, Z. S.; SANTOS, J. F. S.; FREITAS, T. S.; et al. AVALIAÇÃO DO ÁCIDO CAFEICO NA REVERSÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA POR INIBIÇÃO DE BOMBA DE EFLUXO EM *Staphylococcus aureus*. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Artigos Publicados:

MOURA, J.V.B.; FREITAS, T.S.; CRUZ, R.P.; et al. β -Ag₂MoO₄ microcrystals: Characterization, antibacterial properties and modulation analysis of antibiotic activity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*^{JCR}, v. 86, p. 242-247, 2017.

ANDRADE, T.A.; FREITAS, T.S.; ARAÚJO, F.O.; et al. Physico-chemical characterization and antibacterial activity of inclusion complexes of *Hyptis martiusii* Benth essential oil in β -cyclodextrin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*^{JCR}, v. 89, p. 201-207, 2017.

OLIVEIRA, F.S.; FREITAS, T.S.; CRUZ, R.P.; et al. Evaluation of the antibacterial and modulatory potential of α -bisabolol, β -cyclodextrin and α -bisabolol/ β -cyclodextrin complex. *BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY*^{JCR}, v. 92, p. 1111-1118, 2017.

COUTINHO, H.D.M.; OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.; **FREITAS, T.S.**; et al. Toxicity against *Drosophila melanogaster* and antiedematogenic and antimicrobial activities of *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae). *Chemical and Biological Environmental Monitoring*, v. 1, p. 1-9, 2017.

LIMA, V.N.; OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M.; **FREITAS, T.S.**; et al. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. *Microbial Pathogenesis* ^{JCR}, v. 99, p. 56-61, 2016.

SOUSA, D.P.; MONTES, R.C.; **FREITAS, T.S.**; et al. Antimicrobial evaluation of cinnamic and benzoic haloamides. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v. 8, p. 311-320, 2016.

COUTINHO, H.D.M.; ANDRADE, J.C.; **FREITAS, T.S.**; et al. Produção sintética de nutracêuticos x extração natural: aspectos positivos da produção sintética de vitaminas lipossolúveis sobre a extração orgânica em vegetais para conservação da diversidade biológica. *Biofar: Revista de Biologia e Farmácia*, v. 12, p. 1, 2016.