



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA-UEFS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



MANUELA DÓRIA DAS MERCÊS

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Lippia*
(Verbenaceae) DO SEMI-ÁRIDO BAIANO**

Feira de Santana, BA
2011

MANUELA DÓRIA DAS MERCÊS

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Lippia*
(Verbenaceae) DO SEMI-ÁRIDO BAIANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dra. Angélica Maria Luchese

Coorientadoras: Prof^a Dra. Ana Paula Trovatti Uetanabaro

Prof^a Dra. Tânia Regina Silva

Feira de Santana, BA

2011

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me fortalecer nos momentos difíceis e me guiar nas horas incertas.

Aos meus pais, em especial a minha mãe, que sempre fez todos os esforços para me proporcionar a melhor educação possível. Sem ela eu não teria chegado até aqui.

Ao meu namorado Rafael Estrela, pelo amor, apoio, paciência e compreensão nos momentos de ausência em decorrência da pesquisa e do trabalho. Obrigada pelas palavras de incentivo e por tornar dias exaustivos mais suportáveis.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Angélica Maria Lucchese, pela orientação, confiança, conselhos e compreensão com meus horários “alternativos” de trabalho no laboratório e principalmente, com a conciliação do Mestrado, trabalho e curso de especialização.

À coorientadora Prof^a. Dra. Ana Paula Trovatti Uetanabaro, pela cuidadosa correção da parte microbiológica do trabalho.

À Prof. Dra. Carla Mendes, que como disse Fernanda se tornou mesmo uma “coorientadora de plantão” e nos salvou de muitos apuros nas nossas noites de trabalho. Obrigada pelos comentários que tanto enriqueceram nosso trabalho.

À Dra. Edna Peralta, pela ajuda nos experimentos e pela disponibilidade constante.

À inicialmente colega de Mestrado, e agora também amiga Fernanda Pinto, por dividir dias (e principalmente noites) de trabalho. Sem essa parceria e ajuda mútua a realização dos experimentos teria sido uma tarefa bem mais árdua. Foi um prazer e um grande aprendizado trabalhar ao seu lado; sua dedicação, inteligência e simplicidade são inspiradoras.

À Lázaro, pelas inúmeras caronas e também pela ajuda nos experimentos. As biólogas Carla Ribeiro, Suzana Magalhães e Isabella Araújo pela atenção e por se mostrarem sempre disponíveis a ajudar.

À Msc. Cristiana Pinto, pelos dados fornecidos sobre as espécies de *Lippia* abordadas neste trabalho.

À colega de Mestrado e de trabalho Paloma Bahia, pelo incentivo e por “emprestar os ouvidos” sempre que precisei.

Aos amigos Tarcisio Kennedy, Vanessa Pimentel, Verônica Marchesine, Velize Dias e Sarah Fernandes, que mesmo a distância fizeram-se presentes por um telefonema, um *scrap* ou por uma simples lembrança.

Á todos os professores, colegas e amigos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

Á Universidade Estadual de Feira de Santana, especialmente ao Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON) e ao Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM), por fornecer todo o suporte necessário para a realização deste trabalho.

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso,
mas o que ele se torna com isso”.

Jonh Ruskein

“O vento é sempre o mesmo, mas sua resposta é diferente a cada folha”

Cecília Meirelles.

RESUMO

A utilização de plantas medicinais constitui alternativa terapêutica para muitas comunidades. Com o aparecimento de micro-organismos resistentes as drogas convencionais faz-se necessária a busca de novos compostos com propriedades antimicrobianas. Espécies do gênero *Lippia* têm sido usadas na medicina popular no tratamento de doenças respiratórias, gástricas, febre, como tranqüilizantes e também devido a suas reconhecidas propriedades antimicrobianas. Este trabalho teve por objetivo analisar a atividade antimicrobiana e o potencial antioxidante do extrato metanólico de *L. hermannioides*, *L. morii* e *L. subracemosa*. As espécies foram coletadas no semi-árido baiano e foram avaliadas contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (CCMB 262) resistente a estreptomicina e dihidroestreptomicina, *Escherichia coli* (CCMB 261) resistente a sulfonamida e sensível a trimetoprima) *Pseudomonas aeruginosa* (CCMB 268), *Bacillus cereus* (CCMB 282) e as leveduras, *Candida albicans* (CCMB 286) e *Candida parapsilosis* (CCMB 288), ambas resistentes a fluconazol e anfotericina B, pelo método da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Posteriormente, as amostras foram submetidas ao ensaio de atividade antioxidante pelo método do radial livre DPPH e ainda, analisadas quanto ao teor de compostos fenólicos totais e teor de flavonóides. Este estudo permitiu verificar que as espécies *L. hermannioides*, *L. morii* e *L. subracemosa* coletadas no semi-árido baiano possuem atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados e potencial antioxidante.

Palavras - chave: *Lippia*, atividade antimicrobiana, potencial antioxidante.

ABSTRACT

The use of medicinal plants is an alternative therapy for many communities. With the emergence of microorganisms resistant to conventional drugs is necessary to search for new compounds with antibiotic properties. *Lippia* species of the genus have been used in folk medicine to treat respiratory and gastric diseases, fever, such as tranquilizers and also because of its recognized antimicrobial properties. This study aimed to analyze the antimicrobial and antioxidant potential of methanol extract of *L. hermanoides*, *L. morii* and *L. subracemosa*. The species were collected in semi-arid region and were evaluated against *Staphylococcus aureus* (CCMB 262) resistant to streptomycin and dihydrostreptomycin, *Escherichia coli* (CCMB 261) sulfonamide-resistant and sensitive to trimethoprim) *Pseudomonas aeruginosa* (CCMB 268), *Bacillus cereus* (CCMB 282) and yeasts, *Candida albicans* (CCMB 286) and *Candida parapsilosis* (CCMB 288), both resistant to fluconazole and amphotericin B, the method of minimum inhibitory concentration (MIC). Subsequently, the samples were subjected to the test of antioxidant activity by DPPH free radical method and also analyzed the content of total phenolics and flavonoids content. This study showed that the species *L. hermanoides*, *L. morii* and *L. subracemosa* collected in semi-arid region have antimicrobial activity against microorganisms tested and antioxidant potential.

Keywords: *Lippia*, antimicrobial activity, antioxidant potential.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01:	Secagem à temperatura ambiente do material botânico coletado (A); maceração em metanol dos órgãos das espécies vegetais (B); concentração do extrato metanólico em rotaevaporador (C).....	30
Figura 02:	Esquema do ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	33
Figura 03:	Esquema do ensaio de atividade antioxidante utilizando o radical DPPH.....	35
Figura 04:	Esquema do ensaio de determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	37
Figura 05:	Esquema do ensaio de determinação do teor de flavonóides totais.....	38
Figura 06:	Placas do teste de CIM dos extratos metanólicos de folha e caule da espécie <i>L. morii</i> frente a <i>S.aureus</i> CCMB 262 (A), <i>B.cereus</i> CCMB 282 (B), <i>E. coli</i> CCMB 261(C), <i>P. aeruginosa</i> CCMB 268 (D), <i>C. albicans</i> CCMB 286 (E) e <i>C. parapsiloses</i> CCMB 288 (F).....	42
Figura 07:	Placas do teste de CIM dos extratos metanólicos de folha e caule da espécie <i>L. hermannoides</i> frente a <i>S.aureus</i> CCMB 262 (A), <i>B.cereus</i> CCMB 282 (B), <i>E. coli</i> CCMB 261(C), <i>P. aeruginosa</i> CCMB 268 (D), <i>C. albicans</i> CCMB 286 (E) e <i>C. parapsiloses</i> CCMB 288 (F).....	43
Figura 08:	Placas do teste de CIM dos extratos metanólicos de folha e caule da espécie <i>L. subracemosa</i> frente a <i>S.aureus</i> CCMB 262 (A), <i>B.cereus</i> CCMB 282 (B), <i>E. coli</i> CCMB 261(C), <i>P. aeruginosa</i> CCMB 268 (D), <i>C. albicans</i> CCMB 286 (E) e <i>C. parapsiloses</i> CCMB 288 (F).....	44
Figura 09:	Gráfico comparativo entre as amostras expressando a atividade antioxidante em CE ₅₀	50
Figura 10:	Curva padrão do ácido gálico.....	52
Figura 11:	Gráfico comparativo entre as amostras expressando teor de compostos fenólicos totais (mg EAG . g ⁻¹ de extrato).....	53
Figura 12:	Curva padrão da quercetina.....	55
Figura 13:	Gráfico comparativo entre as amostras expressando teor de flavonóides (mgEQ . g ⁻¹ de extrato).....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Identificação das amostras de <i>Lippia</i> (Verbenaceae) coletadas no semi-árido baiano.....	29
Tabela 2 :	Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs), Concentrações Bactericidas Mínimas (CBMs) e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs), em mg.mL ⁻¹ , dos extratos metanólicos de <i>L. hermanoides</i> , <i>L. morii</i> e <i>L. subracemosa</i>	41
Tabela 3:	Rendimentos (%) dos extratos metanólicos obtidos de folhas e caules das espécies de <i>Lippia</i> estudadas.....	76

LISTA DE SIGLAS

CCMB: Coleção de Culturas de Micro-organismos da Bahia.

CMH: Caldo Müeller-Hinton.

CBM: Concentração Bactericida Mínima.

CE₅₀: Concentração efetiva, ou, concentração capaz de inibir 50% dos radicais livres.

CIM: Concentração Inibitória Mínima.

CFM: Concentração Fungicida Mínima.

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazila.

EAG: Equivalente de ácido gálico.

EQ: Equivalente de quercetina.

HUEFS: Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana.

LAPRON: Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos.

LAPEM: Laboratório de Pesquisa em Microbiologia.

LH: *Lippia hermanoides*.

LM: *Lippia morii*.

LS: *Lippia subracemosa*.

nm: Nanômetro.

OH: Hidroxila.

OMS: Organização Mundial de Saúde.

p/v: peso/volume.

R²: Coeficiente de correlação.

TTC: Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio.

UEFS: Universidade Estadual de Feira de Santana.

UFC: Unidade formadora de colônias.

UV: Ultravioleta.

µg: Micrograma.

µL: Microlitro.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	Objetivo Geral.....	14
2.2	Objetivos Específicos.....	14
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
3.1	A utilização de plantas medicinais.....	15
3.2	Família Verbenaceae.....	19
3.3	Usos na medicina popular de espécies do gênero <i>Lippia</i>.....	20
3.4	Composição química e atividade antimicrobiana de espécies do gênero <i>Lippia</i> (Verbenaceae).....	22
3.5	Compostos fenólicos e flavonóides em espécies de <i>Lippia</i>.....	26
4	METODOLOGIA.....	29
4.1	Coleta e identificação das espécies.....	29
4.2	Obtenção dos extratos metanólicos.....	30
4.3	Ensaio de atividade antimicrobiana.....	31
4.3.1	Suspensão de micro-organismos.....	31
4.3.1.1	Bactérias.....	31
4.3.1.2	Leveduras.....	31
4.3.2	Preparo da amostra.....	32
4.3.3	Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	32
4.3.4	Concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM).....	33
4.4	Determinação da atividade antioxidante.....	34
4.5	Determinação de compostos fenólicos totais.....	35
4.6	Determinação de flavonóides totais.....	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1	Atividade antimicrobiana de espécies de <i>Lippia</i> do semi-.....	39

árido baiano.....	
5.2 Atividade antioxidante de espécies de <i>Lippia</i>.....	49
5.3 Compostos fenólicos totais em espécies de <i>Lippia</i>.....	52
5.4 Flavonóides totais em espécies de <i>Lippia</i>.....	54
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
REFERÊNCIAS.....	61
APÊNDICES.	74
ANEXO.....	76

1 - INTRODUÇÃO

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 60% da população dos países em desenvolvimento utilizam para atendimento primário a saúde, especialmente a medicina tradicional, do qual a maior parte envolve o uso de extratos vegetais ou seus princípios ativos (BRASIL, 2006).

No Brasil, a utilização de plantas medicinais para o tratamento das mais diversas enfermidades é um conhecimento pautado no empirismo, está presente em grande parte das famílias e é transmitido através das gerações. As formas de uso das plantas medicinais na terapêutica constituem os chás, os extratos brutos ou suas frações em preparações farmacêuticas e os compostos isolados, usados diretamente como drogas ou precursores em processos de síntese (RATES, 2001).

O estímulo ao uso de recursos terapêuticos vegetais tem aumentado em vista das necessidades de uma crescente população que demanda cada vez mais, plantas medicinais para o cuidado a saúde. Os elevados custos da medicina ocidental, os efeitos colaterais provocados pelos fármacos sintéticos, além do crescente interesse nacional e internacional pelo potencial terapêutico e econômico que representa a biodiversidade brasileira, incrementam as pesquisas que visam ampliar o conhecimento de novas substâncias com propriedades medicinais.

Aliado a este cenário, micro-organismos patogênicos ao homem têm si mostrado cada vez mais resistentes aos agentes terapêuticos convencionais, evidenciando a necessidade da procura por novos antimicrobianos de origem natural que possam funcionar como uma alternativa eficaz.

O potencial antimicrobiano de compostos do metabolismo secundário produzidos pelas plantas já é reconhecido empiricamente através dos séculos, e apenas recentemente vem sendo comprovado por estudos científicos. No entanto, trabalhos científicos que confirmem as propriedades antimicrobianas dessas plantas ainda são limitados.

A literatura aponta que o gênero *Lippia* possui grande potencial para descoberta de substâncias com propriedades medicinais, devido ao uso bastante conhecido dessas plantas pela medicina popular, em doenças infecciosas e nas mais diversas enfermidades (PASCUAL et al 2001; HOLETZ et al 2002; DUARTE et al 2005).

Estudos realizados com extratos de espécies do gênero *Lippia* quanto a sua composição química e ação antimicrobiana ainda são incipientes no Estado da Bahia. Tal pesquisa visa ampliar o conhecimento do potencial medicinal de espécies ainda pouco investigadas do semi-árido baiano.

O presente estudo tem como tema o potencial antimicrobiano e atividade antioxidante de espécies de gênero *Lippia* (Verbenaceae) do semi-árido baiano. A realização desta pesquisa busca detectar se as espécies *L. hermannoides*, *L. morii* e *L. subracemosa* coletadas no semi-árido baiano possuem atividade antimicrobiana, além de determinar seu potencial antioxidante.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral: Investigar o potencial antimicrobiano e a atividade antioxidante de espécies do gênero *Lippia* (Verbenaceae) do semi-árido baiano.

2.2 – Objetivos específicos:

- Determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos metanólicos de *L. hermannioides* Cham., *L. morii* Moldenke e *L. subracemosa* Mansf. frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* (CCMB 262) resistente a estreptomicina e diidroestreptomicina, *Pseudomonas aeruginosa* (CCMB268), *Escherichia coli* (CCMB 261) resistente a sulfonamida e sensível a trimetoprima, *Bacillus cereus* (CCMB 282), *Candida albicans* (CCMB 286) resistente a fluconazol e anfotericina B e *Candida parapsilosis* (CCMB 288)) resistente a fluconazol e anfotericina B pelo método da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM);
- Verificar a atividade antioxidante dos extratos metanólicos de folhas e caules das espécies *L. hermannioides* Cham., *L. morii* Moldenke e *L. subracemosa* Mansf pelo método do radical livre DPPH;
- Determinar teor de compostos fenólicos e teor de flavonóides totais dos extratos metanólicos de folhas e caules das espécies *L. hermannioides* Cham., *L. morii* Moldenke e *L. subracemosa* Mansf. através de espectrometria no UV-visível.

3 – REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 – A utilização de plantas medicinais

O uso de plantas medicinais por diferentes culturas dos mais distintos lugares remonta à Antiguidade. Associadas a medicina popular de diferentes partes do mundo, a fitoterapia já foi mais adotada pela população carente da área rural ou urbana, devido à fácil disponibilidade e menores custos. Hoje, no entanto, o uso de plantas como fonte de medicamentos é predominante em países em desenvolvimento, funcionando como uma solução alternativa para problemas de saúde (SHALE et al, 1999; ARAÚJO; LEON, 2001).

As descobertas de quais espécies vegetais seriam úteis como medicamentos sempre esteve relacionada à observação constante dos fenômenos e características da natureza e posterior experimentação empírica desses recursos. Algumas espécies foram incorporadas ao acaso, levando em consideração os sintomas que apareciam após seu uso, e a depender desses sinais selecionar se determinada espécie seria ou não útil (BUITRON et al, 2006). O homem primitivo, ao procurar plantas para seu sustento, foi descobrindo espécies com ação tóxica ou medicinal, dando início a uma sistematização empírica dos seres vivos, de acordo com o uso que podia fazer deles. (SIMÕES et al, 2004).

No entanto, o principal método para a descoberta das potencialidades terapêuticas das plantas foi à observação do comportamento dos animais domésticos e silvestres. Cães e gatos, por exemplo, consomem ervas irritantes da mucosa estomacal a fim de esvaziarem seus estômagos. (STASI, 1996). Além da observação de animais, uma teoria que tenta explicar a origem dessas descobertas é a *Signatura Rerum* (Teoria das Assinaturas). Atribuída a Paracelso, preconizava que tudo que a natureza cria, recebe a imagem da virtude que ela pretende esconder ali. Desse modo, uma leitura da morfologia externa da planta ou de suas partes – cor, cheiro, disposição dos órgãos e tecidos, habitat e outros – revelaria a atividade terapêutica que ela possui. (DEVIENNE et al, 2004). Os relatos históricos mostram que essa teoria seria a principal técnica utilizada pelo homem para selecionar as plantas medicinais, sendo ainda muito comum verificar este raciocínio

nas populações que se utilizam das plantas como recurso terapêutico principal (STASI, 1996).

Os registros históricos da utilização da terapia com plantas vêm desde o ano de 4000 a.C. Os babilônios e sumerianos (2600 a. C.) escreveram o que se considera como o mais antigo tratado de medicina, a “Tabuinha Sumeriana”, uma coleção de textos descrevendo sintomas de doenças e a prescrição para cada enfermidade (TEIXEIRA, 1994; PARKY, 1966;). Além disso, no antigo código de Hamurabi já se descrevia o ópio, o gálbano, a assafétida, o meimendro e muitos outros produtos vegetais (CUNHA, 2006).

O manuscrito egípcio “Ebers Papyrus” (1.500 a.C.) continha 811 prescrições e 700 drogas. Além dos relatos da utilização de drogas vegetais, minerais e animais, os egípcios utilizavam o azeite, figo, açafraão, pimenta, hortelã, cebola e alho na cura de doenças e no processo de mumificação dos mortos (PARKY, 1966; TEIXEIRA, 1994; TAVARES, 1996). Embora a medicina egípcia se apoiasse em muitos elementos mágicos e religiosos, sabe-se que já eram utilizados o sene, o zimbro, as sementes do linho, o funcho, o rícino e muitas outras plantas (CUNHA, 2006).

Por volta de 100 a.C foi escrito o Sheng Nung Bem Cao Chien (Herbal Clássico do Divino Lavrador), primeiro texto Chinês sobre plantas medicinais que relata nomes, doses e indicações de uso de mais de 250 plantas para o tratamento de mais de 150 doenças (SILVA, 2003). Durante os 1000 anos subseqüentes, culturas paralelas na China, Assíria, Egito e Índia, desenvolveram registros escritos de ervas terapêuticas, descrevendo misturas de utilizações medicinais e mágicas para as plantas.

Na Grécia Antiga, já eram conhecidos o uso de compressas feitas com raízes no estancamento de hemorragias, chás de várias ervas como sudoríferos, óleo de rícino e couve como purgativos, salsa e aspargo como diuréticos e a beladona, ópio e meimendro como narcóticos (TEIXEIRA, 1994; TAVARES, 1996). Foi por volta do século V a.C. que Hipócrates deixa para a história o *Corpus Hipocraticum*, uma obra completa sobre medicina, na qual reconhece as propriedades terapêuticas das plantas medicinais (SILVA, 2003) citando o uso de vegetais, vinhos e bolores para o tratamento de doenças (PARKY, 1966; TAVARES, 1996). A civilização grega deixou ainda como legado os livros “História das Plantas”, “Tratado dos Odores” (300 a. C.)

e *De Re Rustica* (149 a. C) em que são descritas diversas espécies vegetais com suas preparações e usos (PARKY, 1966; TAVARES, 1996).

Durante o Império Romano e começo da era cristã o médico e cirurgião Dioscórides (século I d. C) escreve o “De Materia Medica”, primeiro tratado de medicina da Europa, contendo a descrição e utilização de mais de 600 plantas da Ásia, Grécia, Egito e Itália. Durante o século II d. C. o médico e alquimista Claudius Galenus escreve cerca de 80 livros sobre o uso de diversas drogas vegetais, manipulação e numerosas formulações precursoras das que são utilizadas ainda hoje. Dentre as plantas citadas por ele está a pimenta da Índia para tratamento de febre terçã e salsa para doenças renais (TEIXEIRA, 1994; PARKY, 1966; YAMADA, 1998; SILVA, 2003).

Na Idade Média inicia-se um retrocesso no estudo e utilização das plantas medicinais. Grande parte do que se sabia até então sobre a terapia com plantas ficou em poder da igreja, preservados nas bibliotecas dos mosteiros. Atribuíam-se as plantas e áqueles que lidavam com elas poderes mágicos e sobrenaturais, sendo os remédios preparados por meio de “fórmulas mágicas” (PARKY, 1966). Nesta época, o desenvolvimento da medicina natural ficou restrito aos persas e árabes, que mantiveram as ideias de Hipócrates e Galeno (CUNHA, 2006).

Os árabes dominavam o uso do âmbar, cravo da Índia, gengibre, noz-moscada, cânfora sândalo, ruibarbo, tamarindo, etc (TEIXEIRA, 1994). No século XIII o médico árabe Ibn Al Baitar escreve a enciclopédia médico-botânica “*Corpus Simplicium Medicamentarium*”, abrangendo os conhecimentos herdados dos gregos e caracterizando mais de 2000 produtos, destes, cerca de 1700 de origem vegetal (CUNHA, 2006).

Durante o período da Renascença, marcado pelo estímulo ao pensamento científico, o empirismo da medicina da Idade Média cede lugar à experimentação, ao mesmo tempo em que vão sendo introduzidos na terapêutica novos fármacos, com a chegada dos europeus à África, Índia, Brasil e outros países da América do Sul (TEIXEIRA, 1994; CUNHA, 2006). Os primeiros médicos portugueses que vieram para o Brasil, diante da escassez, na colônia, de remédios empregados na Europa, muito cedo foram obrigados a perceber a importância dos remédios indígenas (PINTO, 2002).

No Brasil, xamãs e pajés, transmitia oralmente as gerações posteriores o conhecimento sobre as propriedades curativas das plantas. Como bons observadores da natureza, os índios conheciam muito bem a fauna e a flora da região e tiravam dali todas as alternativas para suas enfermidades. (SANTOS; ELISABETSKY, 1999). Com a chegada dos europeus ao Brasil, os colonizadores observavam e anotavam o uso freqüente de ervas pelos índios e, por outro lado, o conhecimento dos nativos sobre plantas terapêuticas foi ampliado, incorporando informações e práticas terapêuticas de diversos povos, principalmente de origem européia (CUNHA, 2008).

Durante os séculos XVI a XVIII diversos povos europeus mantiveram contato com o território brasileiro e contribuíram para divulgar informações sobre a flora do Brasil na Europa. Neste período, destaca-se a atuação das Companhias Religiosas, presentes na colônia a fim de difundir a fé cristã, tiveram papel preponderante no intercâmbio de informações entre o Brasil e os colonizadores (CALAINHO, 2005).

Um dos maiores divulgadores das propriedades terapêuticas das ervas brasileiras foi o padre José de Anchieta. Ele citou a ação emética da ipecacuanha e as propriedades anti-sépticas e cicatrizantes do bálsamo copaíba. Já ao padre Fernão Cardim foi responsável pela divulgação de outras plantas, como o jaborandi, a canafístula, o estramônio e o aloés (CUNHA, 2008). Em suas cartas enviadas a Portugal descrevendo a natureza do Brasil, os jesuítas mencionavam diversas ervas curativas, constituindo os primeiros escritos do que viria a ser a primeira farmacopéia brasileira (SANTOS; ELISABETSKY, 1999).

Com a chegada da Família Real ao Brasil e a abertura dos portos as nações amigas, as primeiras expedições científicas chegaram ao país, com o objetivo de coletar e sistematizar espécies da flora e fauna brasileiras (PINTO et al, 2002). Durante esse período chegaram ao Brasil vários estudiosos que foram responsáveis por valiosas observações botânico-médicas sobre plantas locais e pelo início da fitoquímica brasileira. Dentre esses trabalhos, destaca-se o isolamento da agoniadina (plumerídeo) de *Plumeria lancifolia*, primeiro iridóide a ser isolado da natureza em forma pura. Ainda nessa época, foi isolado o alcalóide pereirina das cascas do pau-pereira, primeiro alcalóide a ser isolado puro no Brasil (CARRARA; MEIRELLES, 1996).

A partir do final do século XIX, com o isolamento dos constituintes dotados de ação farmacológica, entra-se numa nova fase da utilização científica das plantas medicinais, com a substituição progressiva destas e dos seus extratos, pelos compostos reconhecidos como responsáveis pela sua ação farmacológica.

A falta de acesso aos medicamentos e à medicina institucionalizada e a insatisfação com os resultados obtidos em tratamentos com a medicina convencional, bem como os efeitos indesejáveis causados pelo uso abusivo e/ou incorreto dos medicamentos sintéticos, são fatores que contribuem para o crescente interesse científico em conhecer o potencial terapêutico dos vegetais (RATES, 2001; COUTINHO et al, 2004). No Brasil, isto significa explorar os recursos vegetais de um país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (SIMÕES et al, 2004).

3.2 – Família Verbenaceae

Espécies da família Verbenaceae prevalecem na América do Sul e Central e África, incluindo aproximadamente 36 gêneros e 1000 espécies. No Brasil ocorrem 17 gêneros (*Aloysia*, *Baillonia*, *Bouchea*, *Casselia*, *Citharexylum*, *Duranta*, *Glandularia*, *Lantana*, *Lippia*, *Monochilus*, *Petraea*, *Phyla*, *Priva*, *Stachytarpheta*, *Tamonea*, *Verbena* e *Verbenoxylum*) e cerca de 250 espécies (BARROSO, 1991; GHEDINI et al, 2002).

As espécies dessa família têm seu potencial econômico amplamente explorado (SANTOS; ELISABETSY, 1999). As mais comuns são ornamentais como *Duranta repens* (douradinha), *Lantana camara* (cambarazinho) e *Petraea volubilis* (flor de São Miguel). Outras espécies são usadas como temperos e flavorizantes devido a presença de óleos essenciais (*Aloysia triphylla*, *Lippia adoensis*, *Lippia alba*, *Lippia berlandieri*, *Lippia graveolens*, *Lippia micromera*, *Lippia organoides*) (ABEGAZ et al, 1993; PASCUAL et al, 2001; ROCHA-GUZMÁN et al, 2007; OLIVEIRA et al, 2007). No entanto, a maioria das espécies dessa família constituem plantas largamente utilizadas na medicina popular (*Aloysia gratissima*, *Aloysia*

sellowii, *Aloysia triphylla*, *Lantana camara*, *Lippia alba*, *Lippia alnifolia*, *Lippia sidoides*, *Lippia thymoides*, *Stachytarpetta cayennensis*, *Verbena litoralis*) (GHEDINI et al 2002; SOUZA; LORENZI, 2005; ROSSATO et al, 2006).

3.3 - Usos na medicina popular de espécies do gênero *Lippia* (Verbenaceae).

O gênero *Lippia* possui aproximadamente 254 representantes, entre espécies, subespécies e variedades de ervas, arbustos e árvores pequenas (TERBLANCHE; KORNELIUS, 1996) concentradas principalmente, no Brasil, Paraguai e Argentina. Na América do Sul a Argentina é particularmente rica em espécies deste gênero (JULIANI et al, 2002). Já no Brasil, os principais locais onde ocorrem maior diversidade são a Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais, e a Chapada Diamantina na Bahia (SALIMENTA, 2002).

Diversas espécies de *Lippia* são utilizadas na medicina popular devido ao seu grande potencial terapêutico. Dentre as enfermidades mais comuns tratadas com plantas deste gênero estão os problemas respiratórios e do trato gastrointestinal, bem como sua utilização em doenças do trato urinário e como sedativo (PASCUAL et al, 2001).

As folhas de *Lippia alba*, popularmente conhecida como erva cidreira, melissa, alecrim-do-compo, salva brava, podem ser empregadas para o tratamento de doenças gástricas, diarreia, febre, asma e tosse, na forma de infusão ou decocção (STANI et al, 2002; MORAIS et al, 2005; TAVARES et al, 2005). Pode ser usada no combate a hemorróidas na forma de compressas; macerada para uso local contra dor de dente, e na forma de banhos como febrífuga. As raízes são utilizadas nas complicações hepáticas e a infusão alcoólica no tratamento de resfriados (AGUIAR; COSTA, 2005) São relatadas também propriedades analgésicas, anti-espasmódicas, calmantes, sedativas e citostáticas (MING, 1992).

L. graveolens (orégano do México) é um arbusto aromático bastante utilizado na culinária como tempero e flavorizante. Na medicina popular suas folhas servem como analgésico, antiinflamatório, antipirético e anti-espasmódico (LEUNG; FOSTER, 1996; PASCUAL et al, 2001). No Brasil, esta planta é conhecida como

alecrim d'Angola ou salva-de-Marajó, sendo a infusão usada no tratamento de cólicas de bebê, diarreia, náuseas, flatulência, doenças vaginais, cólicas menstruais e também como anti-séptico bucal e em feridas (OLIVEIRA, 2004).

Chás e tinturas de *L. chevalieri* são usados no continente africano como sedativo, antimalárico e no trato de doenças respiratórias. (POUSSET, 1989 apud MEVY et al, 2007; GASQUET et al, 1993). Outra espécie deste gênero, *L. javanica*, também é amplamente utilizada neste continente no tratamento da gripe, sarampo, doenças de pele e problemas estomacais. A infusão das folhas é usada contra piolhos, bronquite e febre (WATT; BREYER-BRANDWIJK, 1962; SMITH, 1966; GELFAND et al, 1985; HUTCHINGS, 1996; VANWYK et al, 1997). Sabe-se também que seu óleo essencial é um poderoso repelente de insetos. (GOVERE et al, 2000).

L. multiflora é usada em países da África como sudorífera, laxativa, em cólicas menstruais, problemas no ouvido e, principalmente, devido a suas propriedades anti-sépticas, antifúngicas, anti-maláricas e inseticidas (DALZIEL, 1937; CHANH et al, 1988; PÉLISSIER et al, 1994; KOUMAGLO et al, 1996; OLADIMEJI et al, 2000) A infusão também é empregada no tratamento de distúrbios gastrointestinais, insuficiência hepática, tosse, anti-hipertensivo e como relaxante muscular (ADJANOHOUN et al, 1986 apud ABENA et al, 2003; ADESINA et al, 1993).

Popularmente conhecido como alecrim do mato, alecrim de vaqueiro e pedrecio, *L. alnifolia* é utilizada no tratamento de queimaduras e feridas na pele na forma de infusão das folhas ou tintura. Em compressas, a tintura é usada também no combate a sarna, acne, caspas e odores nos pés e axilas. *L. microphylla* (alecrim-de-tabuleiro, alecrim pimenta) e *L. thymoides* (alecrim-do-mato) são utilizadas respectivamente, como anti-séptico e em doenças respiratórias e no banho para infecções de pele. (FUNCH et al, 2004; AGRA et al, 2007).

Conhecido como cidreira da serra ou alecrim, *L. gracilis* é utilizada como anti-séptico, antimicrobiano e no tratamento de doenças de pele, boca e garganta (PESSOA, 2005; NEVES et al, 2001). *L. jumelliana*, um arbusto aromático e endêmico na Argentina, tem como principal uso na medicina popular o tratamento de problemas no estômago (JULIANI et al, 1996). *L. dulcis* (erva doce) é comumente usada na medicina tradicional no tratamento de condições inflamatórias e na retenção urinária. (WREN, 1970 apud SOUTO-BACHILLER et al, 1997). As partes

aéreas também são empregadas como infusão no tratamento da tosse, dores de estômago e diarreia. (C´ACERES et al, 1993).

Extratos hidro-alcoólicos de *L. sidoides*, popularmente conhecido como alecrim pimenta, são bastante utilizados na medicina tradicional como anti-séptico, antiinflamatório em afecções da boca e garganta, doenças de pele, do couro cabeludo e das mucosas. Como suas propriedades farmacológicas já reconhecidas pela ciência, foi produzido um medicamento fitoterápico de *L. sidoides* na forma de sabonete líquido, usado como anti-séptico (MATOS, 2000; NUNES et al, 2005). *L. adoensis* também é muito utilizada no tratamento de doenças de pele, em infecções fúngicas e eczemas (ABATE, 1989 apud TADEG et al, 2005). Já as folhas de *L. integrifolia* são empregadas no tratamento de distúrbios estomacais e como sedativo (FRICKE et al, 1999).

Em relação a *L. hermannoides*, *L. morii* e *L. subracemosa* não foram encontrados até o momento, relatos na literatura de sua utilização na medicina popular nem de suas propriedades farmacológicas.

3.4 – Composição química e atividade antimicrobiana de espécies do gênero *Lippia* (Verbenaceae).

Em trabalho realizado por Monteiro et al (2007) foi observado que o óleo essencial de *L. sidoides* possui propriedades antioxidantes e antiinflamatórias quando aplicado por via tópica, e que pode funcionar ainda, como um gastroprotector em lesões induzidas pelo álcool em ratos.

Bassole et al (2003) estudando a composição química e as propriedades antimicrobianas de óleos essenciais de *L. chevalieri* e *L. multiflora* concluiu que os componentes majoritários para estas espécies consistem em timol, p- cimeno, 2-fenil etil propionato e timol, p-cimeno e acetato de timila, respectivamente. Foi possível associar o efeito bactericida de *L multiflora* frente à *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus* aos constituintes majoritários de seu óleo essencial. A baixa atividade antimicrobiana de *L.chevalieri* foi explicada por um efeito antagonista entre seus componentes majoritários e secundários.

Em estudo executado por Nogueira et al (2007) com o óleo essencial extraído das folhas de *L.alba* cultivada na região Oeste do Paraná, os autores detectaram a presença de mirceno, linalol, geranial, trans-sabinol, germacreno-D, trans-diidrocarvona, etc. A composição química do óleo essencial da espécie foi analisada nas quatro estações do ano, apresentando variações no rendimento e no teor dos componentes a depender da estação do ano. Ainda neste estudo, a atividade antimicrobiana do óleo essencial foi avaliada pelo método da difusão em disco frente à micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos. As amostras com resultados mais significativos foram a de óleos essenciais extraídos de plantas coletadas durante o verão, estando a atividade antimicrobiana relacionada à presença do trans-dihidrocarvona, geranial, linalol e germacreno D, apontados na literatura como potenciais anti-microbianos (CACERES et al, 1993; PINO et al, 2007 apud NOGUEIRA et al, 2007).

A composição química do óleo essencial de três quimiotipos distintos de *L.alba* de três regiões do Brasil também foi verificada em estudo realizado por Tavares et al, 2005. Tendo como objetivo analisar se as diferenças na composição química do óleo decorrem da variação genética entre indivíduos da mesma espécie ou de condições ambientais, os autores compararam a composição química do óleo essencial dos três quimiotipos extraídos na época de floração e de crescimento vegetativo da planta. Os autores concluíram que houve apenas variação quantitativa dos constituintes majoritários do óleo nos dois períodos de vida das plantas, e que a variação qualitativa dos componentes majoritários não se deve a influência de fatores ambientais, e sim a variação genotípica entre as plantas, já que essas diferenças mantiveram-se no óleo de plantas cultivadas no mesmo canteiro.

Em relação a trabalhos com *L. subracemosa* e *L. morii*, Castro (2005) investigou a composição química e a atividade antimicrobiana do óleo essencial de ambas as espécies. O autor constatou que os constituintes majoritários do óleo essencial das folhas e caule de *L. subracemosa* são os monoterpenos. Nos testes de atividade antimicrobiana o óleo das folhas foi eficiente contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* *Salmonella choleraesuis* e *Candida albicans*. Já para o óleo essencial das folhas de *L. morii*, os constituintes predominantes também foram os monoterpenos; no entanto, na avaliação

antimicrobiana houve inibição apenas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

Como a maioria das espécies do gênero *Lippia* são aromáticas, os estudos sobre composição química e atividade antimicrobiana estão mais direcionados para os óleos essenciais, enquanto ainda pouco se sabe sobre os constituintes não voláteis e suas propriedades (CESAR et al, 2004).

Segundo Matos (2000) os extratos hidro-alcoólicos de *L. sidoides* são largamente utilizados no tratamento de feridas, como anti-séptico bucal e em preparações para tratar e prevenir infecções por fungos em geral. Estudos de P`erez et al (2005) com extrato etanólico e hexânico de *L. dulcis* avaliou a atividade anti-inflamatória em edemas induzidos em patas de ratos. Os autores concluíram que a fração etanólica produziu significativa redução do edema, além de contribuir na cicatrização, enquanto que a fração hexânica foi inativa.

Já Sena Filho et al (2006) avaliando a atividade antimicrobiana dos extratos acetato de etila, metanol e aquoso de raízes de *L. alba* constataram que os extratos acetato de etila e metanol apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. Além disso, os autores detectaram a presença de terpenóides, fenilpropanóides e açúcares, podendo estes constituintes estar relacionados com a ação antimicrobiana apresentada pela espécie.

Em trabalho realizado por Tagami et al (2008) com o objetivo de verificar o efeito do extrato bruto aquoso de plantas com reconhecida atividade antimicrobiana, no crescimento micelial de fungos, demonstrou-se que as amostras testadas tiveram ação fungitóxica significativa contra quatro fitopatógenos. Testado isoladamente na concentração de 36,4 % o extrato de *L. alba* reduziu significativamente o crescimento de *Colletotrichum graminicola* em até 97%. Já para o fungo *Sclerotium rolfsii* maior redução ocorreu com a amostra a 50%, com uma redução de 49% no crescimento do fungo. Para os fungos *Alternaria alternata* e *Rhizoctonia solani*, as amostras de *L. alba* também foram ativas, reduzindo o crescimento do fungo em 13,1% (concentrado a 38,9%) e em 20 % (concentrado a 50 %), respectivamente.

Outros estudos também apontam para a atividade inseticida e repelente de *L. alba* para o controle de fitopatógenos. Santos (1996) e Dwivedi et al (1990) relataram efeito sobre o fungo *Macrophomina phaseolina*, causador da podridão

negra do colmo e para *Colletotrichum gloeosporioides*, responsável pela antracnose foliar. SINGH, et al. (2000) após observar efeito fungicida sobre patógenos da cana-de-açúcar sugeriu a aplicação dessa espécie como possível defensivo agrícola. Os resultados desses estudos apontam para a possibilidade de uso de produtos de origem natural no controle de fitopatógenos, com a vantagem de ser uma prática menos agressiva a saúde humana e ao meio ambiente.

Verificando a composição química de extratos de *L. graveolens*, Lin et al (2007) conseguiram identificar mais de vinte diferentes tipos de flavonóides, dentre eles apigenina, quercetina, pinocembrina, galangina, glicosídeos de luteolina, etc. Costa et al (2002), em seu trabalho com frações acetato de etila e diclorometano, de extratos etanólicos de caules e cascas de *L. sidoides*, conseguiram isolar o flavonóide taxifolina e a lignana isolariciresinol.

Extratos etanólicos a de 10% de *L. sidoides*, também foram testados quanto ao seu potencial antimicrobiano e inflamatório por Girão et al (2001). Nesse estudo foram feitos testes com dez cães apresentando princípio de doença periodontal, cujo objetivo foi demonstrar indicadores clínicos de melhora do periodonto inflamado, tratado com solução aquosa obtida a partir do extrato etanólico de *L. sidoides*. Os resultados indicaram que antes do tratamento nenhum dos animais apresentava boa saúde bucal devido à gengivite inicial, tendo como agente etiológico primário, o acúmulo de placa bacteriana. Mas, após o tratamento 90 % dos animais apresentaram bom estado e apenas 10% evidenciaram placa bacteriana.

Pinto (2008) investigou a atividade antimicrobiana de extratos metanólicos de folhas e caules de *L. hermannioides*, *L. morii* e *L. subracemosa* pelo método de difusão em disco frente a leveduras e bactérias. As cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a Estreptomicina e Dihidroestreptomicina e *Staphylococcus aureus* resistente a Novobiocina foram sensíveis a um número maior de amostras, a de *Pseudomonas aeruginosa* foi sensível apenas ao extrato de folhas de *L. morii*, enquanto o crescimento de *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* não foi inibido pelos extratos testados. Conforme Pinto (2008) os resultados obtidos indicam que trabalhos posteriores de fracionamento biomonitorado das espécies devem ser conduzidos para o isolamento dos princípios ativos.

3.5 – Compostos fenólicos e flavonóides em espécies do gênero *Lippia*.

Os compostos fenólicos são substâncias derivadas do metabolismo secundário de plantas que possuem, pelo menos, um anel benzênico, com um ou mais grupos hidroxilas (OH⁻), livres ou substituídos (CAMPOS, 2004). São amplamente distribuídos no reino vegetal e nos micro-organismos e fazem parte do metabolismo animal, embora, a princípio, os animais não sintetizem o anel aromático, utilizando o anel benzênico proveniente da dieta alimentar (SIMÕES et al, 2004).

Duas rotas biogenéticas mais importantes podem originar os compostos fenólicos: a via do ácido chiquímico a partir de carboidratos que origina a maioria dos compostos fenólicos em plantas (fenilpropanóides, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas, cromonas, etc) e a via do acetato-polimalato iniciando com acetil-coenzima A e malonil-coenzima A que resulta em importantes compostos de cadeia longa a exemplo dos flavonóides, isoflavonóides, diflavonóides e taninos condensados (SIMÕES et al, 2004; DEY; HARBORNE, 1997).

Nos vegetais os compostos fenólicos desempenham importantes funções para a sobrevivência das plantas (LEITÃO et al, 1997). Podem atuar como substâncias de defesa, a exemplo das lignanas, que fornecem proteção mecânica contra micro-organismos e injúrias. Influenciam a competição entre plantas, no fenômeno conhecido como alelopatia e fornecem proteção contra a radiação ultravioleta (DEY; HARBORNE, 1997). No entanto, a mais notável atribuição desses compostos consiste em contribuir para coloração, odor e sabor dos vegetais, características ligadas a polinização e dispersão de sementes pelos animais (SIMÕES et al, 2004; DEY; HARBORNE, 1997).

As diversas propriedades desses compostos despertaram o interesse farmacológico e da indústria de alimentos por essas substâncias (YEN et al, 1997). Tem-se como exemplo do emprego farmacêutico dos compostos fenólicos, a hidroquinona utilizada no tratamento local da hiperpigmentação, pela sua capacidade de redução da síntese de melanina (DEY; HARBORNE, 1997), o guaiacol na forma de seu éter glicerínico, a guaifenesina, usada como expectorante (SIMÕES et al, 2003) e a droga vegetal uva-ursina, que apresenta altos teores de glicosídeos de fenóis simples e taninos derivados do ácido gálico, empregada tradicionalmente

no tratamento de infecções urinárias e descrita como adstringente e antisséptica por diversas farmacopéias (JAHODAR et al, 1997; SIMÕES et al, 2004). Na indústria alimentícia os compostos fenólicos são economicamente importantes devido a seu uso como corantes, flavorizantes e aromatizantes de bebidas e alimentos (SIMÕES et al, 2004).

Dentre os compostos fenólicos mais importantes e diversificados está o grupo dos flavonóides. Esses metabólitos são sintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e geralmente se apresentam oxigenados, conjugados com açúcares ou na forma livre. A forma conjugada ou heterosídeos ocorre quando a ligação com o açúcar se dá através de uma ligação intermediada por uma hidroxila (O-heterosídeos) ou com um átomo de carbono (C-heterosídeos). Quando na forma livre, sem conjugação com açúcares, o flavonóide é chamado de aglicona ou genina (SIMÕES et al, 2004).

Amplamente distribuído nos vegetais e apresentando grande diversidade estrutural, a função dos flavonóides nas plantas está relacionada à proteção contra o ataque de insetos, bactérias e fungos, atração de polinizadores, proteção contra os raios ultravioletas, reguladores de hormônios e inibidores de enzimas (DEY; HARBORNE, 1997; ZUANAZZI; MONTANHA, 2003; BARROS, 2008).

Em decorrência da abundância e variedade desses compostos nos vegetais, tem aumentado o interesse pela determinação de suas propriedades farmacológicas e emprego terapêutico desses metabólitos (GUERECA et al, 2008). Consistem algumas atividades farmacológicas atribuídas aos flavonóides: antiinflamatória (ABAD et al, 1993; BRANDÃO et al, 2007; VIANA, et al, 1998), antiviral (LIN, et al, 2007; ALEA, et al, 1997), antimicrobiana (SENA FILHO et al, 2006; SIMÕES et al, 2004), antitumoral (MATOS et al, 1996), antioxidante (SOARES, 2001; SIMÕES et al, 2004) e antiespasmódica (ADER et al, 2000).

Estudos realizados sobre a composição química do gênero *Lippia* relatam a presença de compostos fenólicos e flavonóides em várias espécies deste gênero. Largamente utilizada na medicina popular em diversas enfermidades, o potencial terapêutico dessa espécie pode estar relacionado, em parte, a presença dessas substâncias (AGUIAR et al, 2005).

Guereca et al (2008) estudando a composição química de *Lippia graveolens* relatou a presença de naringenina, kampeferol, isokampeferol e quercetina. Já Lin et al (2007) trabalhando com a mesma espécie conseguiu identificar mais de vinte tipos

diferentes de flavonóides, entre eles a pinocembrina, apigenina, galangina e quercetina, citadas na literatura como potenciais agentes antitumorais, antioxidantes e citoprotetores (GREENHAM et al, 2003; LIN et al, 2007; PASCUAL et al, 2001).

Derivados do ácido cinâmico (ácido p-cumárico, ácido caféico, ácido sináptico e ácido ferúlico) também já foram identificados em diversas espécies de *Lippia* (PASCUAL et al, 2001; SLOWING BARILLAS, 1993). Este gênero apresenta uma grande variedade de derivados do ácido caféico, e um desses derivados, o verbascosídeo ou acteosídeo, já foi identificado em *L. dulcis* (PÉREZ et al, 2005), *L. multiflora* (RODOLFO et al, 2006) e *L. javanica* (CARVALHO, 2006; OLIVIER et al, 2010). São atribuídas a esta substância atividade antiinflamatória (SCHAPOVAL et al, 1998), citoprotetora, (LIU et al, 2003; WONG et al, 2001), cardiotônica (PENNACCHIO et al, 1996), antimetastásica (PEREZ et al, 2005) e notável atividade antioxidante (WONG et al, 2001). Segundo Chiou et al (2004) o efeito citoprotetor e antioxidante deste composto provavelmente estaria relacionado a sua capacidade seqüestradora de radicais livres, sendo esta atividade mais pronunciada neste metabólito que em alguns antioxidantes de referência como o ácido ascórbico, o alfa-tocoferol e o resveratrol.

4 – METODOLOGIA

Inicialmente foi realizada uma pesquisa bibliográfica em livros, artigos e revistas pertinentes ao tema.

A etapa seguinte envolveu a pesquisa experimental caracterizada pela realização dos testes de atividade antimicrobiana (Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida/Fungicida Mínima) e pela determinação da atividade antioxidante, compostos fenólicos, e quantificação dos flavonóides das amostras.

As análises antimicrobianas foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM); quanto à atividade antioxidante, determinação de flavonóides e compostos fenólicos, os estudos foram feitos no Laboratório de Química de Produtos Naturais (LAPRON), ambos na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

Na última etapa os resultados foram organizados em tabelas e gráficos a fim de facilitar a análise e comparação das informações obtidas com a literatura científica.

4.1 – Coleta e identificação das espécies.

As coletas foram realizadas em dois municípios do semi-árido baiano observando as datas, localização e condições climáticas da região. As amostras foram depositadas no Herbário da UEFS (HUEFS) e identificadas pela Prof^a Dra. Tânia Regina da Silva.

Tabela 1: Identificação das amostras de *Lippia* (Verbenaceae) coletadas no semi-árido baiano.

AMOSTRA	LOCAL DA COLETA	DATA DA COLETA	IDENTIFICAÇÃO
LH	Mucugê	30/4/2006	<i>L. hermannioides</i> Cham.
LM	Rio de Contas	18/8/2006	<i>L. morii</i> Moldenke
LS	Rio de Contas	18/8/2006	<i>L. subracemosa</i> Mansf

Fonte: Pinto, 2008.

4.2 – Obtenção dos extratos metanólicos.

Os extratos brutos foram obtidos pela técnica de maceração utilizando metanol como solvente e em seguida foram concentrados por rotaevaporação.

Todo o material botânico coletado foi seco à temperatura ambiente ao abrigo do calor (Figura 1 A); posteriormente, foram pulverizadas com auxílio de moinho de facas.

Em seguida, realizou-se as extrações das folhas e caules das espécies selecionadas utilizando metanol por período de dez dias (Figura 1B). Os extratos brutos foram concentrados em evaporador rotatório (Figura 1C) sob pressão reduzida e temperatura variando entre 40 e 42 °C. O resíduo do solvente foi retirado por evaporação em capela de exaustão, sendo que as amostras que apresentaram água residual foram submetidas ao processo de liofilização, para finalmente, serem acondicionadas em frascos de vidros (Pinto, 2008).



Figura 1: Secagem à temperatura ambiente do material botânico coletado (A); maceração em metanol dos órgãos das espécies vegetais (B); concentração do extrato metanólico em rotaevaporador (C).

Fonte: Pinto, 2008.

4.3 – Ensaio de atividade antimicrobiana.

Para a realização dos ensaios de atividade antimicrobiana foi utilizada a metodologia descrita no Clinical and Laboratory Institute (CLSI) 2003 com modificações.

4.3.1- Suspensão de micro-organismos.

4.3.1.1 - Bactérias

Os micro-organismos foram repicados em placas de Petri com meio de cultura ágar Mueller Hinton e incubados a 37 °C por um período entre 18-24h.

Em um tubo estéril adicionou-se solução salina a 0,45%. Com alça de repique retirou-se uma pequena quantidade da cultura de micro-organismo que foi acrescentada ao tubo. A suspensão foi levada ao turbidímetro calibrado e ajustada para a faixa de leitura vermelha da escala de McFairland que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹. Tomou-se 10µL dessa suspensão que foi diluída em 990 µL de solução salina a 0,45% obtendo a suspensão de trabalho com concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC. mL⁻¹.

As bactérias pertencentes à Coleção de Cultura de Micro-organismos da Bahia (CCMB), fornecidas pelo LAPEM, Departamento de Biologia, UEFS foram: *Staphylococcus aureus* (CCMB 262) resistente a estreptomicina e dihidroestreptomicina, *Pseudomonas aeruginosa* (CCMB268), *Escherichia coli* (CCMB 261) resistente a sulfonamida e sensível a trimetoprima e *Bacillus cereus* (CCMB 282).

4.3.1.2 – Leveduras

Os micro-organismos foram repicados em placas de Petri com meio de cultura ágar Mueller Hinton e incubados a 28 °C por um período entre 36-48h.

Em um tubo estéril adicionou-se 1,8 mL de solução salina a 0,45%. Com alça de repique retirou-se uma pequena quantidade da cultura de micro-organismo que

foi acrescentada ao tubo. A suspensão foi levada ao turbidímetro calibrado e ajustada para a faixa de leitura amarela da escala de McFairland que corresponde a 5×10^5 UFC.mL⁻¹ (suspensão de trabalho).

As leveduras pertencentes à Coleção de Cultura de Microrganismos da Bahia (CCMB), fornecidas pelo LAPEM, Departamento de Biologia, UEFS foram: *Candida albicans* (CCMB 286) resistente a fluconazol e anfotericina B e *Candida parapsilosis* (CCMB 288) resistente a fluconazol e anfotericina B.

4.3.2 – Preparo da amostra

Pesou-se 0,022 g de extrato bruto que foi solubilizado em sulfóxido de dimetila (DMSO) a 50 %. Todas as amostras foram esterilizadas em membrana celulósica de 0,22 µm.

4.3.3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Em placa estéril de 96 poços foi colocado 90µL de meio de cultura caldo Mueller Hinton (CMH) 2X concentrado na primeira coluna (1) nos poços 1A a 1F. Nos poços seguintes (demais colunas de 2 a 12) colocou-se 90µL de meio de cultura 1X concentrado. Foi adicionado 90µL da amostra de extrato nos poços de 1A a 1F da coluna 1 da placa e homogeneizou-se 15 vezes com o auxílio de pipeta automática

Procedeu-se à diluição seriada retirando 90µL dos 1^{os} poços (coluna 1, linhas A a F) e transferindo para o 2^o (coluna 2, linhas A a F) homogeneizando 15 vezes após a transferência. Repetiu-se esse procedimento até os poços da coluna 12. Chegando aos últimos poços retirou-se 90µL que foi descartado. Adicionou-se, individualmente, em todos os poços, 10µL de suspensão de micro-organismo. Os controles do meio de cultura, do micro-organismo e das amostras foram realizados por placa nos poços das linhas G e H (Figura 2).

As placas foram incubadas por 24 h a 37°C para as bactérias e por 48 h a 28°C para as leveduras. Após o período de incubação adicionou-se em cada poço

30 μL do revelador resazurina e 50 μL do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) para bactérias e leveduras, respectivamente. Reincubou-se as placas nas respectivas temperaturas e o resultado do teste foi lido após três horas. Considerou-se como resultados válidos, aqueles correspondentes aos poços coloridos em azul para as bactérias, enquanto que para as leveduras, foram considerados os poços sem alteração de cor.

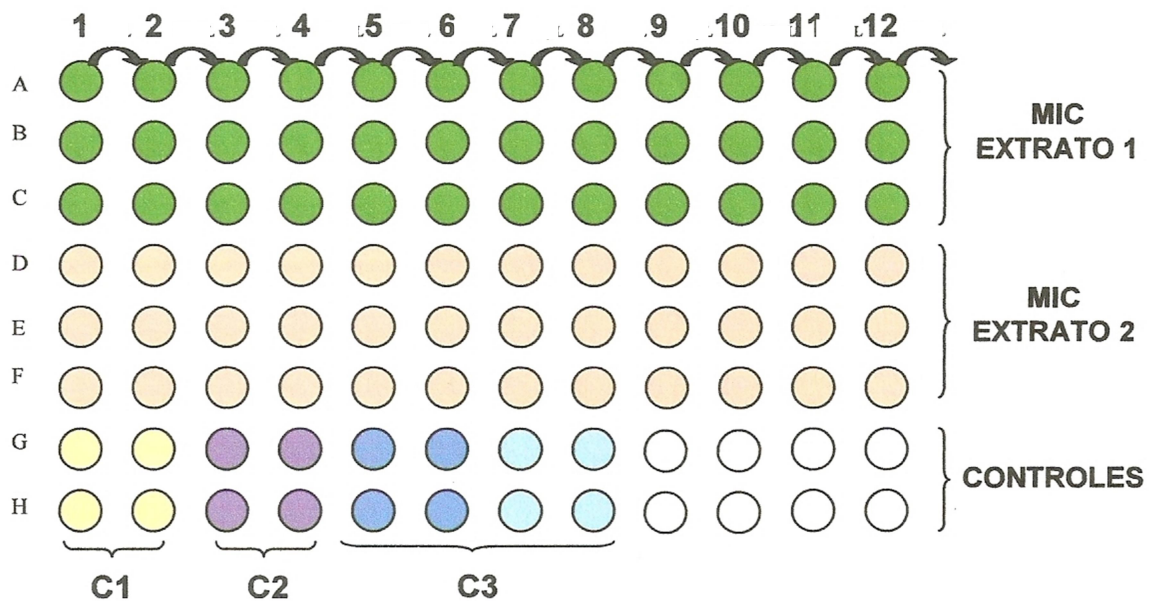


Figura 2: esquema do ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM). Linhas A, B e C: amostra 1. Linhas D, E e F: amostra 2; C1: controle de esterilidade do meio de cultura; C2: controle da viabilidade microbiana; C3: controle de esterilidade das amostras.

Fonte: Pinto, 2008.

4.3.4 - Concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM)

O teste de Concentração Bactericida/Fungicida Mínima tem por objetivo determinar a menor concentração da amostra que reduz ou inibe o crescimento microbiano.

Para realização desse teste foram utilizadas placas de Petri com meio ágar geleificado divididas em quadrantes, cada um correspondendo a um poço da placa de CIM.

Com auxílio de uma pipeta automática, foram retirados 10 µL de cada poço das placas de CIM em que houve inibição do crescimento microbiano que foram transferidos para a placa de Petri. O conteúdo do primeiro poço (A1) foi colocado no primeiro quadrante da placa de Petri (A1) e assim sucessivamente, até uma linha após aquela considerada como resultado do CIM.

As placas foram incubadas por 24 h a 37°C (bactérias) e por 48 h a 28°C (leveduras). Depois desse período, considerou-se como Concentração Bactericida Mínima e Concentração Fungicida Mínima, para bactérias e leveduras, respectivamente, a menor concentração da amostra onde não ocorreu crescimento microbiano.

4.4 – Determinação da atividade antioxidante.

A atividade antioxidante dos extratos metanólicos de folhas e caules das espécies de *Lippia* foi determinada pelo método do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) segundo Cordeiro (2009) com algumas adaptações. O método de determinação da atividade antioxidante utilizando DPPH como reagente baseia-se na capacidade da amostra de sequestrar o radical livre e, na determinação da variação da absorvância obtida da solução do radical por perda estequiométrica da cor, em função da presença de substâncias antioxidantes contidas na amostra.

Para análise da atividade antioxidante das amostras adicionou-se 2 mL de uma solução metanólica de DPPH 0,004% a 1mL da amostra diluída em metanol nas seguintes concentrações: 100 µg.mL⁻¹, 65 µg.mL⁻¹, 50 µg.mL⁻¹, 45 µg.mL⁻¹, 30 µg.mL⁻¹, 25 µg.mL⁻¹, 20 µg.mL⁻¹, 15 µg.mL⁻¹, 10 µg.mL⁻¹ e 5 µg.mL⁻¹. Como controle da amostra foi utilizada a mistura de 2 mL de metanol com 1 mL de amostra. As amostras foram mantidas ao abrigo da luz por um período de 30 minutos, tempo necessário para ocorrer a reação entre o radical livre e amostra. Como branco utilizou-se 3 ml de metanol espectroscópico.

As leituras foram realizadas três triplicatas em um espectrofotômetro Femto Plus 700 com absorvância a 517 nm. Calcularam-se as médias e o desvio-padrão para os dados encontrados, sendo posteriormente realizado o cálculo da porcentagem de inibição do radical pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(\text{Abs. do DPPH} - (\text{Abs. da reação final} - \text{Abs. do controle da amostra})) \times 100}{\text{Abs. do DPPH}}$$

Como o teste foi realizado em três triplicatas, o resultado final considerado foi a média das porcentagens de inibição do radical encontradas em cada triplicata (Figura 03).

Foi utilizada como padrão a rutina, testadas nas concentrações de $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $12 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, seguindo a mesma metodologia.

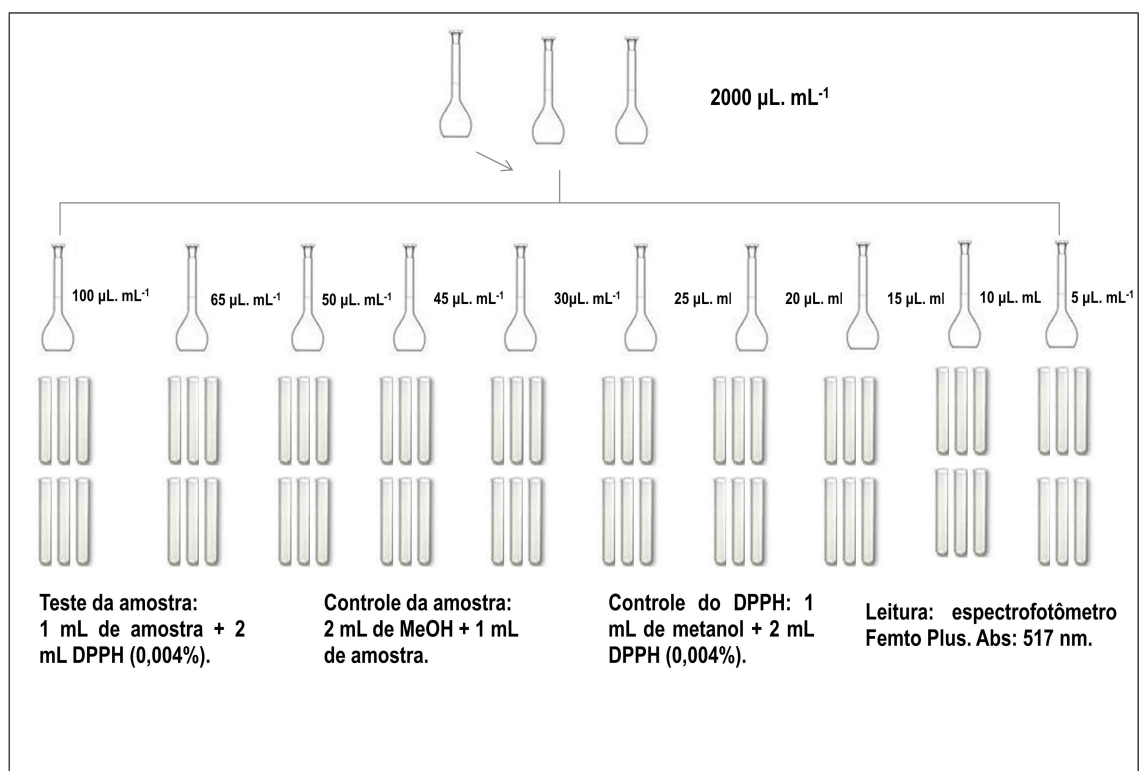


Figura 03: esquema do ensaio de atividade antioxidante utilizando o radical DPPH.

Fonte: autor

4.5 – Determinação de compostos fenólicos totais.

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado através de espectrometria no UV-visível utilizando reagente de Folin-Ciocalteu segundo metodologia de Peres et al, (2009) com modificações. O teste baseia-se em reações de oxi-redução entre os compostos fenólicos da amostra e íons metálicos do

reagente de Folin-Ciocalteu. Em meio alcalino, os fenóis reduzem o fosfomolibdato-fosfotungstato, a molibdênio, resultando em uma solução de coloração azulada. (SILVA et al., 2010).

Preparou-se uma solução metanólica do extrato a 0,1% pesando-se em balão volumétrico de 10 mL, 0,01g do extrato e avolumando com metanol grau espectroscópico. Dessa solução, foi tomada uma alíquota de 100 μ L que foi transferida para balão volumétrico de 5 mL. Em seguida, foi adicionado a solução, 1 mL de água destilada e, posteriormente, 200 μ L do reagente de Folin-Ciocalteu.

Após repouso de 5 minutos, foi adicionado 600 μ L de uma solução de Na_2CO_3 (carbonato de sódio) a 20% e o balão foi avolumado com água para 5 mL. Decorridos 90 minutos em temperatura ambiente, as absorbâncias das amostras foram lidas em espectrômetro a 750 nm, em cubetas de quartzo.

Os testes foram realizados em três triplicatas, utilizando como branco uma solução aquosa do reagente de Folin-Ciocalteu sem a presença do extrato.

Foi construída uma curva de calibração com padrão de ácido gálico testados nas concentrações de 50, 100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ conforme metodologia descrita para as amostras. O teor de compostos fenólicos totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra a curva de calibração do ácido gálico e expresso mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por mg de extrato. Foi realizado um ajuste linear dos pontos da curva para a obtenção da equação da reta e do coeficiente de correlação (R^2), expressa como: $y = ax + b$, em que y foi a absorbância da amostra a 750 nm e x, a concentração de ácido gálico em μL .

Considerou-se como resultado final a média dos resultados encontrados nas três triplicatas do teste. A Figura 04 mostra um esquema do ensaio de determinação do teor de compostos fenólicos totais.

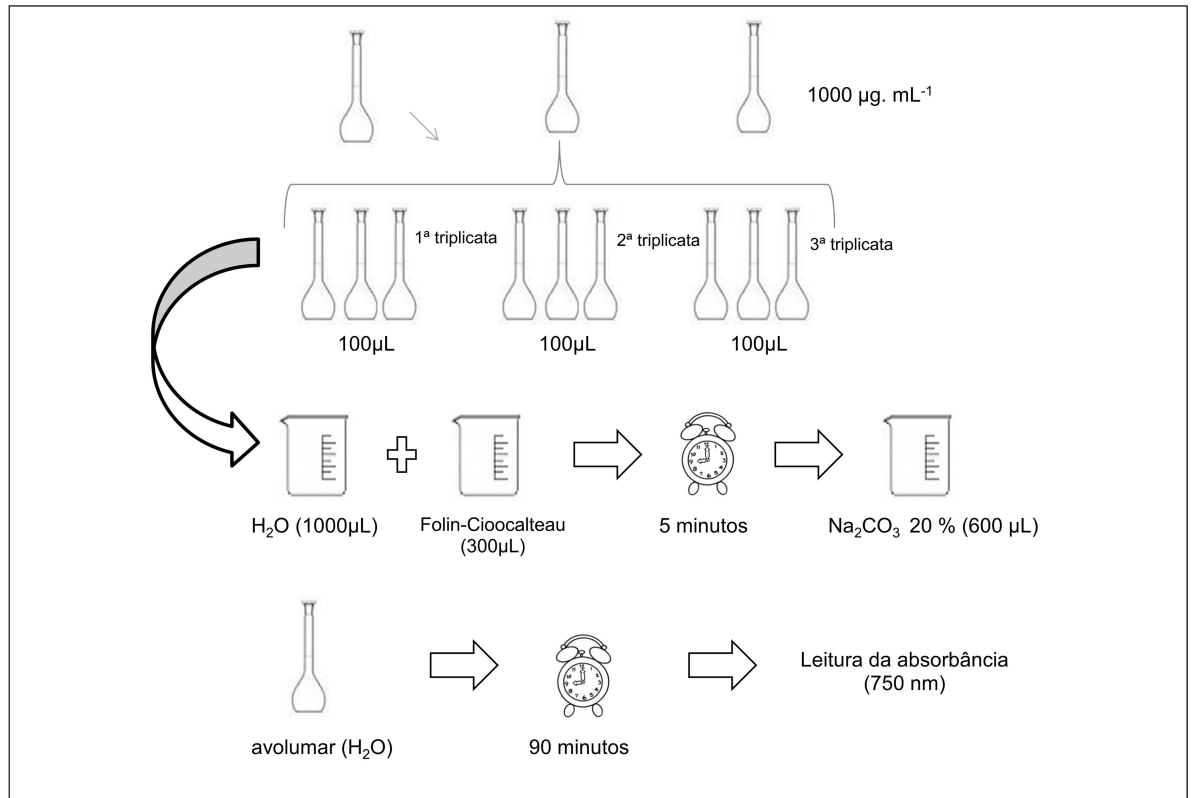


Figura 04: esquema do ensaio de determinação do teor de compostos fenólicos totais.
Fonte:autor

4.6 – Determinação de flavonóides totais.

O teor de flavonóides totais foi determinado através de espectrometria no UV-visível com uso de cloreto de alumínio (AlCl₃) segundo metodologia de Banov et al, (2006) e Woisky et al, (1996) com adaptações.

Foi preparada uma solução metanólica do extrato bruto a 1000 µg/mL. Desta solução, tomou-se 3 mL, que foi transferido para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 200 µL de solução metanólica de AlCl₃ 5% avolumando o balão com solução metanólica de ácido acético 5%.

Após 30 minutos, a absorbância das amostras foram lidas em espectrofotômetro a 425 nm em cubetas de quartzo, utilizando como branco uma solução metanólica de AlCl₃ 5% e solução metanólica de ácido acético 5% (Figura 05).

O teor de flavonoides de cada extrato foi determinado pela interpolação da absorbância das amostras, contra uma curva de calibração construída utilizando quercetina nas seguintes concentrações: 3 µg/mL, 6 µg/mL, 9 µg/mL, 12 µg/mL, 15 µg/mL e 18 µg/mL. Foi realizado um ajuste linear dos pontos da curva para a obtenção da equação da reta ($y = ax+b$, em que y foi a absorbância da amostra a 425 nm e x , a concentração de quercetina em µL) e do coeficiente de correlação (R^2)

Os testes foram realizados em três triplicatas e os resultados foram expressos em mg de EQ (equivalentes de quercetina) por g de extrato bruto, considerando como resultado final a média dos resultados encontrados nas três triplicatas do teste.

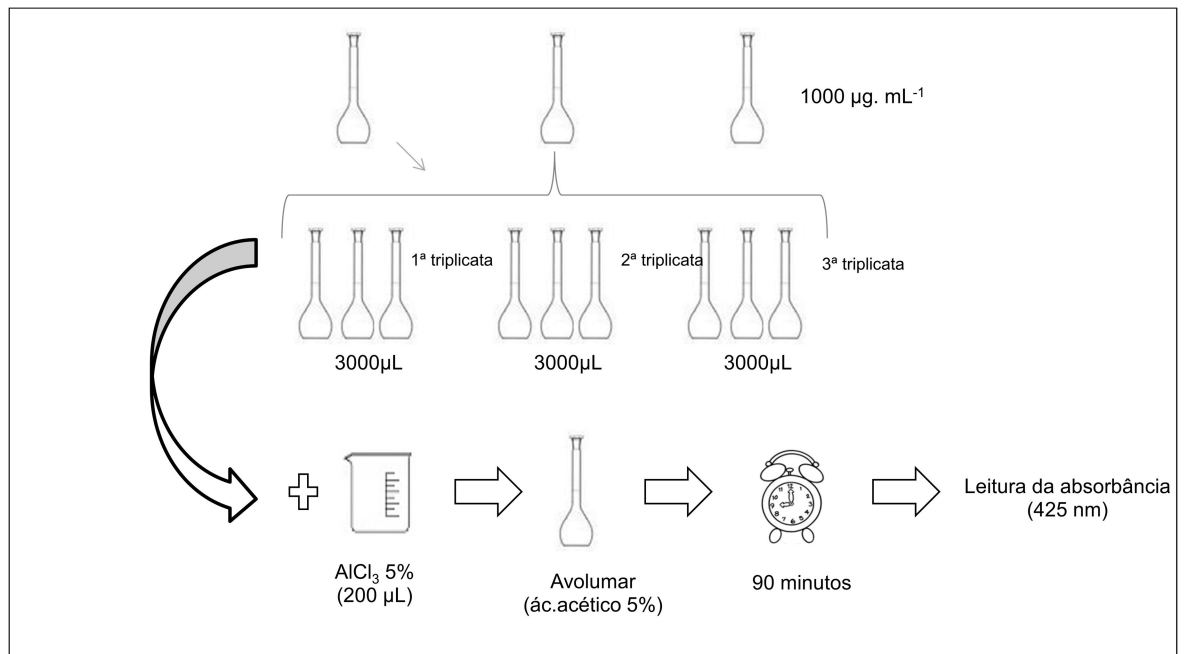


Figura 05: esquema do ensaio de determinação do teor de flavonóides totais.

Fonte: autor

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Atividade antimicrobiana de espécies de *Lippia* do semi-árido baiano.

Os extratos das espécies de *Lippia* utilizados nesse trabalho foram produzidos através de extração com metanol pelo processo de maceração. A secagem do material vegetal foi realizada à temperatura ambiente e, em seguida, o processo de maceração, foi o método escolhido para este trabalho, pois muitos princípios ativos vegetais são termolábeis. Além disso, o metanol foi empregado por ser considerado como o solvente mais adequado para obtenção de extratos brutos e possibilita a extração de um maior número de compostos, já que grande maioria dos compostos ativos vegetais são substâncias orgânicas solúveis em metanol (CALIXTO 2001; SIMÕES et al, 2004).

De acordo com dados fornecidos por Pinto 2008, os rendimentos obtidos a partir dos diferentes órgãos das espécies de *Lippia* estão sumarizados no Anexo 01.

As análises de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) foram realizadas com os extratos metanólicos das espécies *L. hermannioides* Cham., *L. morii* Moldenke e *L. subracemosa* Mansf. frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* CCMB 262 resistente a estreptomicina e dihidroestreptomicina, *Pseudomonas aeruginosa* CCMB268, *Escherichia coli* CCMB 261 resistente a sulfonamida e sensível a trimetoprima, *Bacillus cereus* CCMB 282, *Candida albicans* CCMB 286 resistente a fluconazol e anfotericina B e *Candida parapsilosis* CCMB 288 resistente a fluconazol e anfotericina B.

A realização do teste de CBM/CFM tem por objetivo determinar se as CIMs encontradas para as amostras são resultantes de atividade bacteriostática ou bactericida. Resultados de CBM/CFM com concentrações superiores ao resultado encontrado para a CIM constituem amostras com atividades bacteriostáticas e resultados de CBM/CFM com concentrações iguais a CIM determinam amostras com atividade bactericida. Foi observado que cinco resultados significativos encontrados para este trabalho foram resultantes de atividade bacteriostática das

amostras avaliadas, enquanto que onze resultados significativos apontaram para atividade bactericida das amostras (Tabela 02).

Foram realizados ainda, testes controle positivo com antimicrobianos e com o solvente DMSO. Em virtude de o DMSO apresentar atividade antimicrobiana que pode interferir no resultado da concentração inibitória mínima das amostras, foi considerado como resultado significativo para este trabalho, valor de CIM inferior ao resultado obtido para o DMSO para cada micro-organismo testado. Para os micro-organismos *B.cereus* CCMB 282, *E.coli* CCMB 261, *C.albicans* CCMB 286 e *C.parapsiloses* CCMB 288, o resultado do CIM do DMSO foi 12,5 %, valor que corresponde a concentração do extrato de 5,5 mg.mL⁻¹. Dessa forma, foram adotados como resultados significativos para esses micro-organismos, amostras com valores de CIM iguais ou inferiores a 2,8 mg.mL⁻¹. Para *P. aeruginosa* CCMB 268 e *S.aureus* CCMB 262, foram detectados valores de CIM do DMSO de 6,2 % e 3,1 %, correspondentes a 2,8 mg.mL⁻¹ e 1,39 mg.mL⁻¹ para as concentrações dos extratos; os resultados significativos para esses micro-organismos foram valores iguais ou inferiores a 1,39 mg.mL⁻¹ e 0,70 mg.mL⁻¹, respectivamente. A utilização do DMSO neste estudo foi necessária a fim de facilitar a dissolução das amostras e possibilitar a realização do teste. Contudo, o DMSO pode facilitar a difusão de substâncias através de membranas biológicas e provavelmente, potencializa o efeito antimicrobiano dessas substâncias (RIBEIRO et al, 2001).

Embora Lima et al (2008) tenham observado que baixas concentrações de DMSO (1% a 0,06 %) não modificaram a viabilidade nem o crescimento microbiano, há diversos relatos na literatura que apontam para um aumento da efetividade de determinada droga quando associada ao DMSO em concentrações superiores a 30 %. Já foram citadas melhoria na atividade do antifúngico griseofulvina (MALE, 1968) de sais de amônio quaternário (ROSEN et al, 1965) e de glicosídeos cardiotônicos (MELVILLE et al, 1968). A atividade bacteriostática dessa substância foi demonstrada ainda, por Ghajar et al (1968) que constataram aumento da permeabilidade da membrana de *S.aureus* em contato com DMSO. Os autores atribuíram a esta substância a capacidade de desnaturar o RNA transportador e interromper a síntese protéica.

Os valores significativos de CIM detectados para espécies de *Lippia* estão destacados em vermelho na Tabela 02.

Tabela 02: Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs), Concentrações Bactericidas Mínimas (CBMs) e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs), em mg.mL⁻¹, dos extratos metanólicos de *L. hermanoides*, *L. morii* e *L. subracemosa*.

EXTRATO / CONTROLES	Concentração Mínima (mg.mL ⁻¹)											
	<i>S.aureus</i>		<i>B.cereus</i>		<i>E.coli</i>		<i>P.aeruginosa</i>		<i>C. albicans</i>		<i>C. parapsiloses</i>	
	CCMB 262	CCMB 262	CCMB 282	CCMB 282	CCMB 261	CCMB 261	CCMB 268	CCMB 268	CCMB 286	CCMB 286	CCMB 288	CCMB 288
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CFM	CIM	CFM
LH folhas	0,7	1,39	1,39	1,39	5,55	5,5	2,8	2,8	1,39	2,8	5,55	5,55
LH caules	1,39	2,8	1,39	2,8	2,8	2,8	1,39	1,39	2,8	2,8	5,55	5,55
LM folhas	0,35	0,35	1,39	1,39	5,55	5,55	1,39	2,8	2,8	5,55	2,8	2,8
LM caules	1,39	1,39	2,8	2,8	5,55	5,55	2,8	2,8	5,55	5,55	2,8	2,8
LS folhas	1,39	2,8	2,8	2,8	5,55	5,55	2,8	2,8	5,55	5,55	5,55	5,55
LS caules	2,8	2,8	2,8	2,8	5,55	5,55	2,8	5,55	5,55	5,55	5,55	5,55
Cloranfenicol	0,625	-	0,078	-	0,005	-	0,005	-	NA		NA	
Nistatina	NA		NA		NA		NA		0,0003	-	0,312	-
DMSO	1,39	-	5,5	-	5,55	-	2,77	-	5,55	-	5,55	-

LH folha: *L.hermanoides* folhas; LH caules: *L.hermanoides* caules; LM folhas: *L.morii* folhas; LM caules: *L.morii* caules; LS folhas: *L.subracemosa* folhas; LS caules: *L.subracemosa* caules.

NA: Não se aplica

(-) Teste não realizado.

Fonte: autor

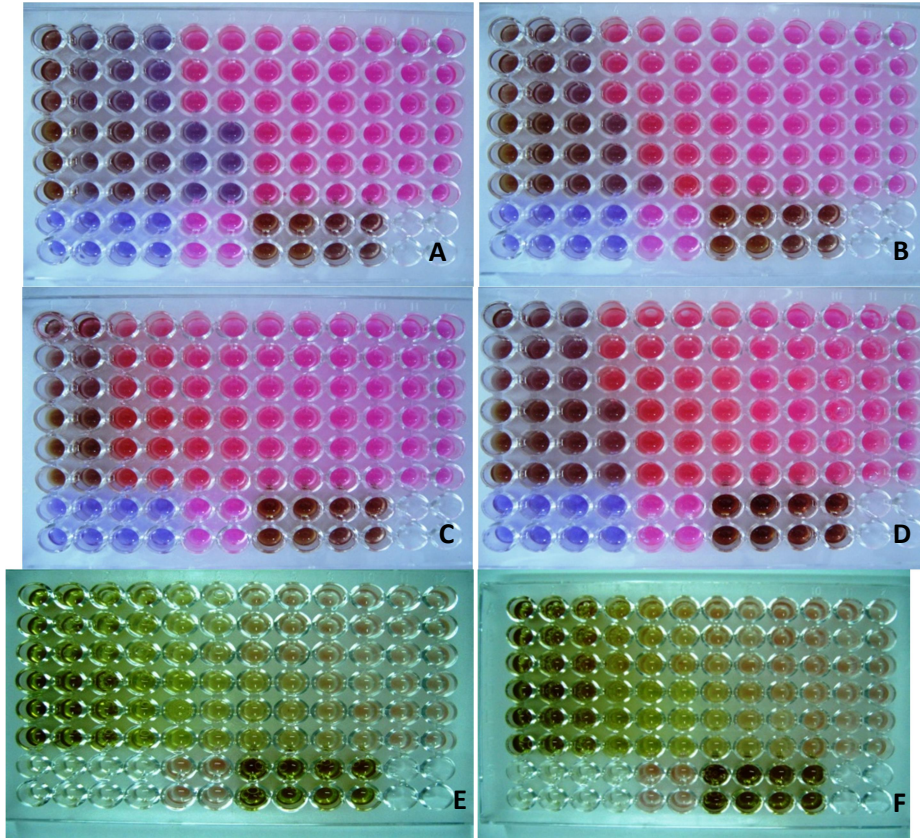


Figura 06: Placas do teste de CIM dos extratos metanólicos de folha e caule da espécie *L. morii* frente a *S.aureus* CCMB 262 (A), *B.cereus* CCMB 282 (B), *E. coli* CCMB 261(C), *P. aeruginosa* CCMB 268 (D), *C. albicans* CCMB 286 (E) e *C. parapsiloses* CCMB 288 (F). Linhas A, B e C: extrato do caule. Linhas D, E e F: extrato das folhas. Poços G1, G2, H1e H2: controle de esterilidade do meio de cultura 1X concentrado. Poços G3, G4, H3 e H4: controle do meio de cultura 2 X concentrado. Poços G5, G6, H5 e H6: controle da viabilidade microbiana. Poços G7, G8, H7 e H8: controle de esterilidade do extrato da folha. Poços G9, G10, H9 e H10: controle de esterilidade do extrato do caule (seguir esquema p.33).

Fonte: autor

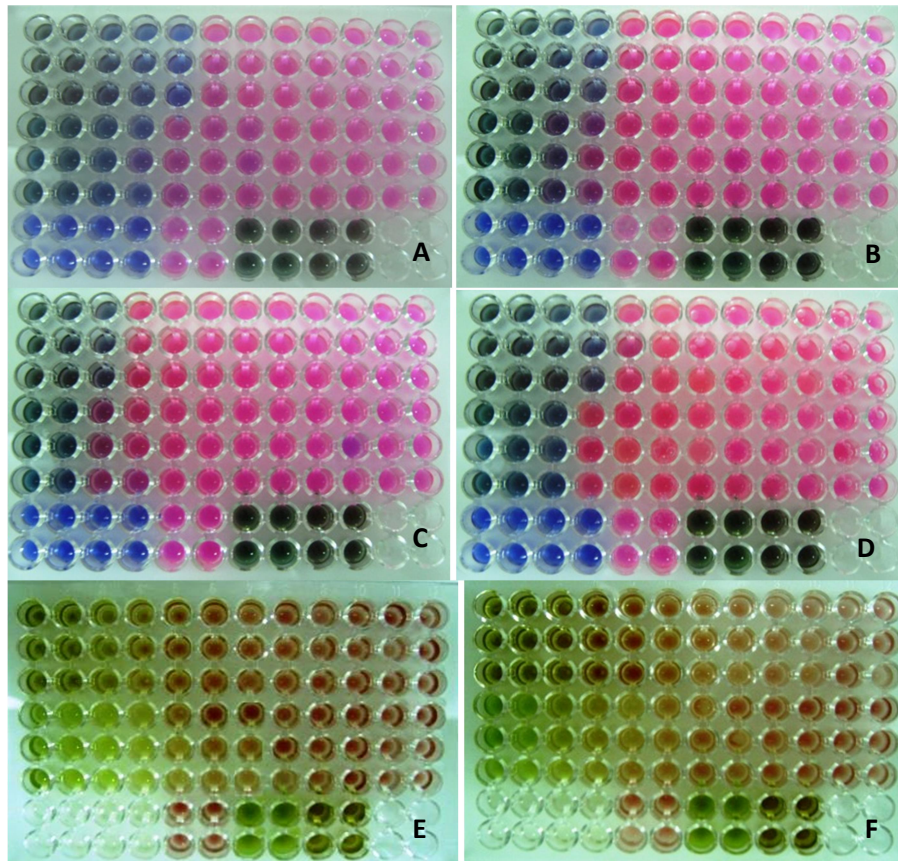


Figura 07: Placas do teste de CIM dos extratos metanólicos de folha e caule da espécie *L. hermannoides* frente a *S.aureus* CCMB 262 (A), *B.cereus* CCMB 282 (B), *E. coli* CCMB 261(C), *P. aeruginosa* CCMB 268 (D), *C. albicans* CCMB 286 (E) e *C. parapsiloses* CCMB 288 (F). Linhas A, B e C: extrato do caule. Linhas D, E e F: extrato das folhas. Poços G1, G2, H1e H2: controle de esterilidade do meio de cultura 1X concentrado. Poços G3, G4, H3 e H4: controle do meio de cultura 2 X concentrado. Poços G5, G6, H5 e H6: controle da viabilidade microbiana. Poços G7, G8, H7 e H8: controle de esterilidade do extrato da folha. Poços G9, G10, H9 e H10: controle de esterilidade do extrato do caule (seguir esquema p.33)

Fonte: autor

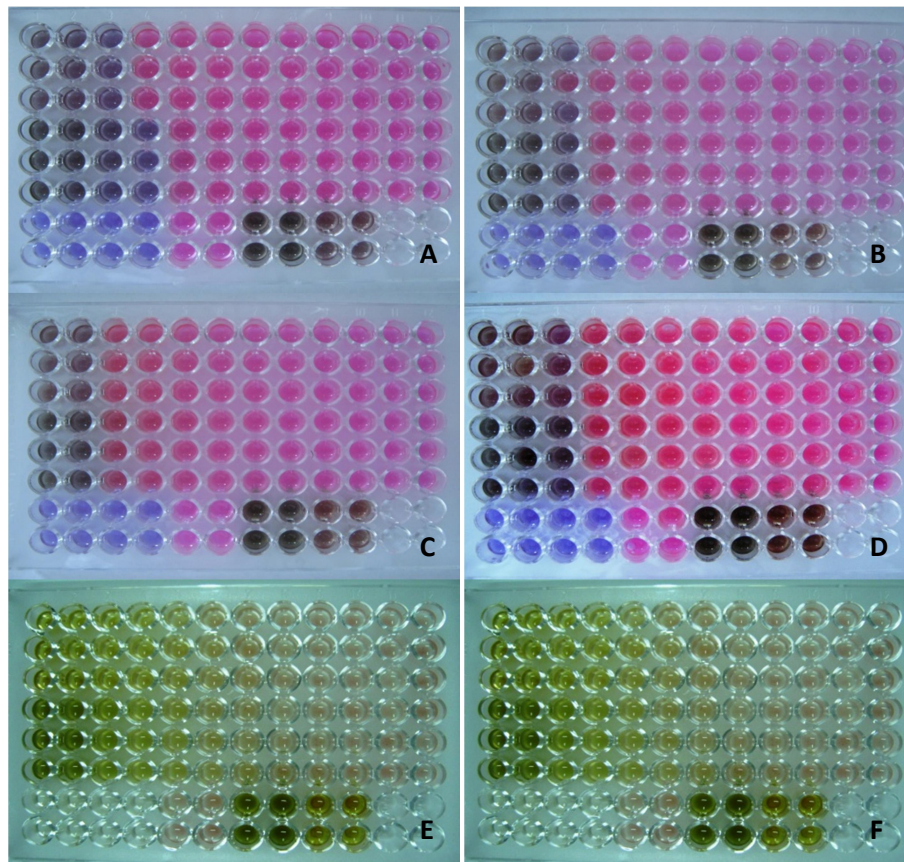


Figura 08: Placas do teste de CIM dos extratos metanólicos de folha e caule da espécie *L. subracemosa* frente a *S.aureus* CCMB 262 (A), *B.cereus* CCMB 282 (B), *E. coli* CCMB 261(C), *P. aeruginosa* CCMB 268 (D), *C. albicans* CCMB 286 (E) e *C. parapsiloses* CCMB 288 (F). Linhas A, B e C: extrato do caule. Linhas D, E e F: extrato das folhas. Poços G1, G2, H1e H2: controle de esterilidade do meio de cultura 1X concentrado. Poços G3, G4, H3 e H4: controle do meio de cultura 2 X concentrado. Poços G5, G6, H5 e H6: controle da viabilidade microbiana. Poços G7, G8, H7 e H8: controle de esterilidade do extrato da folha. Poços G9, G10, H9 e H10: controle de esterilidade do extrato do caule (seguir esquema p.33).

Fonte: autor

Todas as amostras testadas pelo método de CIM apresentaram atividade antimicrobiana a pelo menos um micro-organismo (Tabela 02) A bactéria Gram-positiva *B.cereus* CCMB 282 foi sensível a todas as amostras testadas, sendo que as amostras obtidas de *L.subracemosa* foram ativas frente a somente este micro-organismo (Figura 08).

As amostras LM folhas e LH caules foram as que apresentaram melhor efetividade em inibir o crescimento microbiano, já que ambas impediram o crescimento de cinco e quatro micro-organismos, respectivamente (Figura 06 e Figura 07). Destacam-se os resultados obtidos para a amostra LM folhas que apresentou atividade antimicrobiana frente às duas bactérias Gram-positivas testadas e a uma Gram-negativa (*P. aeruginosa* CCMB 268), além das duas leveduras. Para esta amostra também foi encontrada a menor CIM detectada nesse estudo, $0,35 \text{ mg.ml}^{-1}$, frente ao micro-organismo *S.aureus* CCMB 262 (Tabela02).

A amostra LH caules mostrou-se mais ativa frente às bactérias Gram-negativas do que frente as Gram-positivas, sendo a única amostra de extrato testada que conseguiu inibir o crescimento de *E.coli* CCMB 261. Em relação às bactérias Gram-positivas, foi ativa apenas contra *B.cereus* CCMB 282, expressando atividade bacteriostática (Tabela 02). Embora as concentrações dos extratos necessárias para inibir o crescimento dos micro-organismos Gram-negativos foram em maior parte, superiores do que as requeridas para os Gram-positivos, esses resultados podem ser considerados promissores, em vista da maior dificuldade em se encontrar possíveis agentes antimicrobianos de origem natural com atividade para essas bactérias. Além disso, os resultados encontrados para LH caules contradiz o que preconiza a literatura para extratos de *Lippia*; dessa forma, sugere-se o fracionamento do extrato obtido a partir dessa espécie, seguido de um estudo bio-guiado, a fim comprovar esses resultados e identificar possíveis metabólitos responsáveis por uma maior atividade frente a bactérias Gram-negativas.

Ainda comparando os resultados obtidos para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, observou-se que um maior número de amostras (LH folhas, LM caules, LS folhas e LS caules) foram efetivas contra bactérias Gram-positivas enquanto que duas (LH caules e LM folhas) foram ativas contra as Gram-negativas. Um dos fatores que pode explicar a menor atividade antimicrobiana das amostras frente às bactérias Gram-negativas seria a diferença na constituição da parede

celular entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. No que se refere às bactérias Gram-negativas a parede celular é menos espessa e quimicamente mais complexa, apresentando uma membrana mais externa que pode impedir a entrada das moléculas do extrato vegetal. Além disso, o espaço periplasmático é composto por enzimas hidrolíticas capazes de inativar moléculas estranhas introduzidas no meio (DUFFY; POWER, 2001).

Esses resultados reproduzem o que tem sido apontado na literatura para extratos metanólicos de espécies de *Lippia* e para plantas medicinais em geral (AVANCINI et al, 2000; HOLETZ, et al, 2002). Vera et al, (2007) trabalhando com extratos metanólicos e óleo essencial de *L.alba* pelo método da difusão em disco, encontraram os maiores halos de inibição para *S.aureus* e *C.albicans* do que para *E.coli*. Ainda trabalhando com extratos metanólicos de *L. alba* frente a *S.aureus* e *Klebsiella pneumonia*, Sena Filho et al, (2006) observaram concentrações de inibição inferiores para duas cepas distintas de *S.aureus* quando comparado com a bactéria Gram-negativa. Este mesmo padrão se repetiu para o trabalho de Pinto, (2008) com amostras de *L. microphylla* e *L. thymoides* testadas pelo método da CIM e da difusão em disco, contra duas cepas de *S.aureus*, *E. coli*, *P.aeruginosa*, *C.albicans* e *C.parapsiloses*. Foi possível constatar que em ambos os ensaios, as bactérias Gram- positivas seguidas da levedura *C.albicans*, apresentaram comportamento de maior sensibilidade, sendo que as amostras foram inativas contra *E. coli* e *C.parapsiloses*

Em relação aos resultados encontrados para as leveduras, apenas o extrato de *L. subracemosa* não apresentou atividade frente a pelo menos um dos micro-organismos utilizados. As amostras LH folhas e LH caules foram ativas frente a *C.albicans* CCMB 286 somente, com concentrações de 1,39 mg.mL⁻¹ e 2,8 mg.mL⁻¹. mg.mL⁻¹ , respectivamente. LM caules foi ativa contra *C.parapsiloses* CCMB 288 (2,8 mg.mL⁻¹) e LM folhas foi a única amostra com atividade expressa para as duas leveduras, ambas na concentração de 2,8 mg.mL⁻¹. Além de um maior número de amostras serem ativas frente às bactérias, as concentrações inibitórias encontradas para as leveduras, foram superiores do que as encontradas para a maioria das bactérias. De acordo com Selitrennikoff (2001), isso pode estar relacionado à estrutura da parede celular fúngica, que difere da bacteriana em sua composição,

apresentando como principais constituintes a quitina e o 1,3- β -glicano, que podem dificultar a passagem do agente antimicrobiano para o interior da célula.

Estudos etnofarmacológicos apontam que espécies do gênero *Lippia* têm sido utilizadas pela população no tratamento de infecções fúngicas (FENNER et al,2006). Matos et al (1999), relata que as partes aéreas de *L.gracilis* e *L.sidoides* são empregadas no tratamento de dermatoses, da caspa e como antifúngico local. Em trabalho executado por Holetz et al (2002) com *L.alba*, os autores concluíram que esta espécie possui atividade antifúngica de leve a moderada para *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. Farias et al. (2000) também observaram atividade contra *C.tropicalis*, *C. krusei* e *C.albicans* obtidas de secreção vaginal para os extratos etanólicos de *L.sidoides*. Considerando a necessidade de novos compostos com propriedades antifúngicas que possam funcionar como alternativa e a importância do estudo das plantas medicinais para o desenvolvimento de novos fármacos, estes resultados sugerem que espécies do gênero *Lippia* deve ser alvo de mais pesquisas para descoberta de novas substâncias com atividade contra fungos.

Comparando os resultados encontrados para extratos de folhas e de caules, houve um melhor desempenho antimicrobiano dos extratos obtidos das folhas de espécies de *Lippia* do que dos respectivos caules. Dos dezesseis resultados significativos encontrados neste trabalho, nove foram para amostras de folha e sete para amostras obtidas a partir dos caules. Além disso, as menores CIMs detectadas foram para amostras obtidas a partir das folhas (LM folhas: 0, 35 mg.mL⁻¹ e LH folhas 0, 70 mg.mL⁻¹, ambas para *S.aureus* CCMB 262). Para LM folhas foram obtidos cinco resultados significativos (*S.aureus* CCMB 262, *B.cereus* CCMB 282, *P.aeruginosa* CCMB 268, *C.albicans* CCMB 286 e *C.parapsiloses* CCMB 288), enquanto que dois resultados foram considerados válidos para amostra dos caules (*B.cereus* CCMB 282 e *C.parapsiloses* CCMB 288). No entanto, o comportamento inverso foi observado para amostras de *L. hermannoides*, com quatro resultados significativos para amostra dos caules (*E.coli* CCMB 261, *B.cereus* CCMB 282, *P.aeruginosa* CCMB 288 e *C.albicans* CCMB 286) e três para amostra das folhas (*S.aureus* CCMB 262, *B. cereus* CCMB 282 e *C. albicans* CCMB 286). Amostras de *L.subracemosa* apresentaram apenas um resultado significativo tanto para folhas quanto para os caules.

No presente trabalho, uma melhor atividade antimicrobiana dos extratos derivados das folhas das espécies em estudo, pode se justificar pela diferença quantitativa entre os constituintes químicos presentes em folhas e caules de espécies de *Lippia*.

Sabe-se que as partes áreas de espécies de *Lippia* apresentam como principais constituintes químicos os compostos fenólicos, terpenos, triterpenos, esteróides, iridóides, saponinas, quinonas e taninos. No entanto, esses constituintes podem estar presentes em maior ou menor quantidade nos diversos órgãos da planta (RICE- EVANS et al, 1996). As folhas de espécies de *Lippia* são notadamente ricas em flavonóides e cumarinas, substâncias apontadas na literatura como potenciais agentes antimicrobianos. Em estudo realizado por Aguiar et al (2008), com extratos de folhas, caules e raízes de *L.alba*, foi observada atividade antimicrobiana apenas para extratos obtidos de folhas e raízes da planta. As amostras de caule não apresentaram atividade pelo teste da difusão em disco. Diferentemente dos resultados obtidos por esses autores, a maioria dos trabalhos com extratos de caules de espécies de *Lippia* relatam bom desempenho das amostras obtidas a partir deste órgão vegetal. Porém, ainda são escassos trabalhos de triagem fitoquímica objetivando determinar separadamente folhas e caules e quantificar, os principais componentes presentes nos diferentes órgãos de espécies de *Lippia*. (JULIÃO et al, 2003; SOARES, 2001; BARBOSA, 2003).

Espécies do gênero *Lippia*, apesar de amplamente difundidas e utilizadas na medicina popular, ainda necessitam de mais estudos que comprovem suas propriedades farmacológicas e orientem seu emprego terapêutico. Os resultados obtidos nesse estudo apontam para a necessidade da ampliação dessa investigação, tanto no que se refere ao espectro das amostras pesquisadas quanto ao fracionamento dos extratos, visando trabalhos posteriores de isolamento dos constituintes com potencial antimicrobiano.

5.2 – Atividade antioxidante de espécies de *Lippia*.

A atividade antioxidante de uma substância pode ser definida como a capacidade que ela tem de proteger sistemas biológicos contra os efeitos prejudiciais das reações de oxidação, envolvendo espécies reativas de oxigênio conhecidos como radicais livres (HALLIWELL, 1996). Quando em contato com as biomoléculas, os radicais livres reagem com substratos das moléculas biológicas causando sérios danos, desde a peroxidação dos lipídios de membrana celular até o ataque as moléculas de DNA (HUSAIN et al, 1987; BARREIROS; DAVID, 2006).

Para lutar contra os efeitos causados pelos radicais livres, o organismo é capaz de produzir enzimas ou micromoléculas que atuam diretamente contra esses radicais ou reparam os danos causados por eles. Outra maneira de obter substâncias que combatem os radicais livres é através da dieta (HALLIWELL, 1996; BARREIROS; DAVID, 2006).

Produtos de origem vegetal como frutas, sementes, óleos e plantas aromáticas são reconhecidamente fontes de antioxidantes (OLIVEIRA et al, 2009). Diversos relatos na literatura apontam que plantas aromáticas e condimentares têm suas propriedades (aroma e sabor) relacionadas à presença de compostos antioxidantes (BARA et al, 2006; MANTOVANI; PORCU, 2009). Para espécies de *Lippia*, tanto os óleos essenciais quanto os seus componentes não voláteis, tem sido alvo de diversos estudos do seu potencial oxidante e dos compostos químicos responsáveis por essa atividade (SOUZA et al, 2007; BARATTA et al, 1998; MORAIS et al, 2009).

Dentre as técnicas utilizadas para avaliar a atividade antioxidante de um composto, o método do radical livre DPPH• é um dos mais utilizados. O radical livre DPPH• é um cromóforo extremamente estável que apresenta um pico de absorção no comprimento de onda de 517 nm e sua solução possui uma coloração violeta intensa. Conforme o DPPH• vai sendo reduzido por uma substância antioxidante, seu elétron se torna emparelhado e a absorvidade desaparece. A partir da monitoração do decréscimo da absorbância é possível determinar a quantidade de DPPH• consumido pelo antioxidante e a porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional. (BRAND-WILLIAMS, 1995).

Foram realizados testes de atividade antioxidante nas amostras de *Lippia* que já haviam sido analisadas quanto ao seu potencial antimicrobiano. Os resultados foram expressos como CE_{50} , isto é, como a concentração estimada de extrato necessária para consumir metade (50%) do DPPH (BOSCOLO et al, 2007). No Apêndice A estão apresentados os gráficos que correlacionam o percentual de DPPH remanescente *versus* a concentração da amostra, a equação resultante do ajuste linear nos pontos do gráfico e os coeficientes de correlação (R^2) para a rotina. Na Figura 09 estão expressos como médias de seis etapas independentes e o desvio-padrão, os resultados de CE_{50} das amostras estudadas.

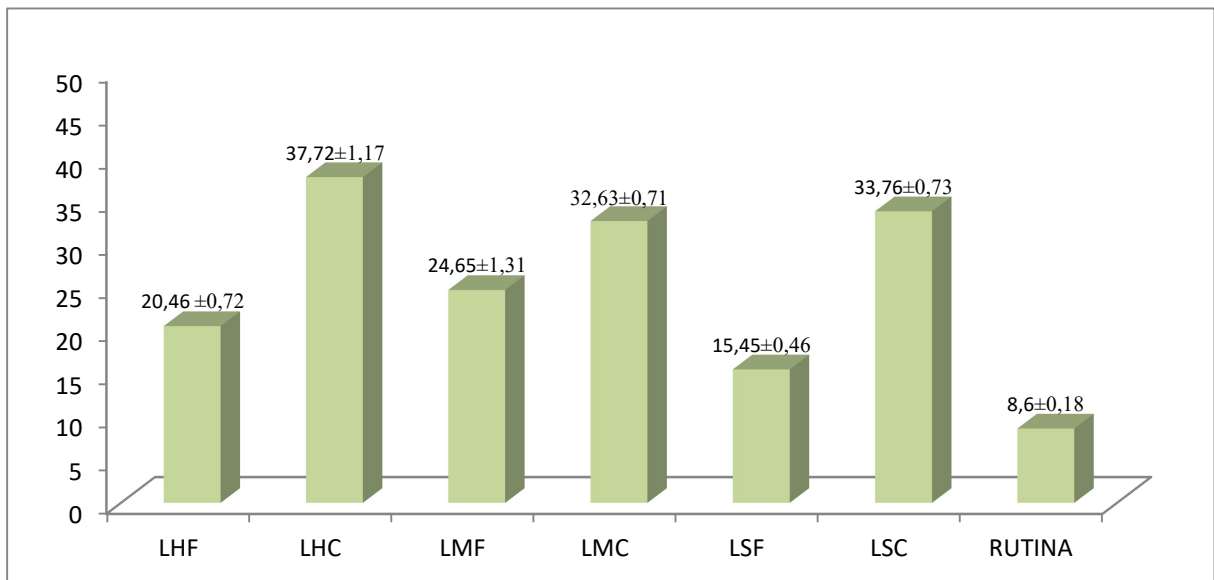


Figura 09: Gráfico comparativo entre as amostras expressando a atividade antioxidante em CE_{50} .

Fonte: autor

De acordo com o gráfico (Figura 09), as amostras com melhor atividade antioxidante foram LS folhas e LH folhas em virtude de apresentarem as menores CE_{50} ($15,45 \pm 0,46 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $20,46 \pm 0,72 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente). Quanto menor é a CE_{50} de uma amostra, maior é sua atividade antioxidante, já que a mesma necessita de concentrações menores para um maior consumo de DPPH (SOUSA et al, 2007). Comparando os resultados encontrados para as amostras de folhas e de caules, foi possível observar que todas as amostras de folhas apresentaram menores CE_{50} que as amostras de caules, cujos valores foram bem semelhantes

entre si. Em relação aos testes com micro-organismos, não foi possível fazer uma relação direta da atividade antimicrobiana das amostras LS folhas e LH folhas e sua atividade antioxidante, já que a primeira foi ativa apenas contra o micro-organismo *B. cereus* CCMB 282 e a segunda contra três micro-organismos (*S.aureus* CCMB 262, *B.cereus* CCMB 282 e *C.albicans* CCMB 286) dos seis testados.

Até o momento não foram encontrados na literatura estudos sobre o potencial antioxidante das espécies de *Lippia* abordadas neste trabalho. No entanto, diversas pesquisas envolvendo outras espécies de *Lippia* têm relatado atividade antioxidante para o gênero.

Trabalhando com extratos etanólicos de *L. citriadora* Funes et al (2010) constataram atividade antioxidante dessa espécie *in vitro* e *in vivo*. Estes autores ainda conseguiram isolar um composto fenólico dessa planta denominado verbacosídeo, provavelmente relacionado com a atividade antioxidante expressa pelo vegetal.

Merece destaque o estudo coordenado por Martínéz-Rosa (2008) em que foram testados extratos metanólicos de *L. graveolens* de três localidades distintas do México, pelo método do radical DPPH. Os autores realizaram também doseamento de compostos fenólicos e flavonóides e ensaio de atividade antimutagênica. As CE_{50} encontradas nesse estudo variaram entre 152-207 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e foi possível associar esses dados com os resultados observados para as outras análises, já que amostras com menores CE_{50} apresentaram maior teor de compostos fenólicos e flavonóides e melhor atividade antimutagênica.

Os resultados de atividade antioxidante observados nesse trabalho estão de acordo ao que a literatura aponta para espécies de *Lippia*. Assim como nos ensaios antimicrobianos, uma das amostras que de maneira geral, apresentou melhor atividade antioxidante foi a obtida a partir das folhas de *L.morii*, que demonstrou melhor potencial antimicrobiano entre as espécies estudadas. Segundo Barreiros; David, 2006 a atividade antioxidante dos vegetais está relacionada à ação de compostos químicos que apresentam grupo fenólico em sua estrutura, a exemplo dos flavonóides, taninos e cumarinas. Uma investigação mais aprofundada da composição química dessa espécie seria bastante útil para direcionar possíveis compostos responsáveis pela ação antioxidante e antimicrobiana da mesma.

5.3 – Compostos fenólicos totais em espécies de *Lippia*.

A determinação de compostos fenólicos totais em plantas tem despertado considerável interesse atualmente, em virtude do potencial antioxidante e antimicrobiano dessas substâncias. Embora o mecanismo de ação antimicrobiana ainda não tenha sido estabelecido, estudos apontam para a utilização desses compostos como uma alternativa para os atuais conservantes alimentícios e seus efeitos nocivos à saúde, além de contribuírem para uma dieta saudável, já que estão relacionados com a redução do risco de doenças cardiovasculares, câncer e doenças inflamatórias crônicas (HEIM et al, 2002; PROESTOS et al, 2006; DEY; HARBORNE, 1997).

Os extratos metanólicos de folhas e caules de *Lippia* foram submetidos à análise de compostos fenólicos totais, através de método colorimétrico, sendo empregado o reagente de Folin-Ciocalteu. Após determinação da atividade antimicrobiana e antioxidante das amostras, este ensaio foi realizado a fim de apontar possíveis fatores responsáveis pelo potencial antioxidante das espécies.

Foi utilizado ácido gálico como padrão neste ensaio, construindo uma curva de calibração (Figura 10) representando a concentração de compostos fenólicos correspondente a ácido gálico (eixo x) *versus* a absorbância (eixo y).

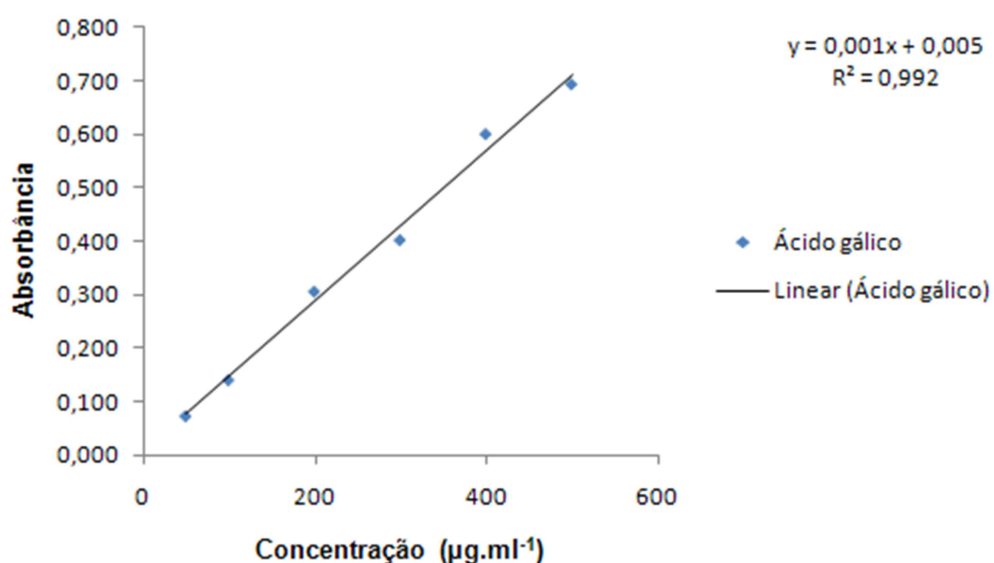


Figura 10: Curva padrão do ácido gálico.

Fonte: Pinto, 2011.

Os resultados obtidos para este teste foram expressos em equivalente grama de ácido gálico (mg EAG . g⁻¹ de extrato), o que significa que quanto maior a quantidade de ácido gálico encontrada por equivalente grama de extrato, maior é a quantidade de compostos fenólicos na amostra em análise. Na Figura 08 estão expressos como médias de três etapas independentes os resultados de compostos fenólicos totais das amostras estudadas.

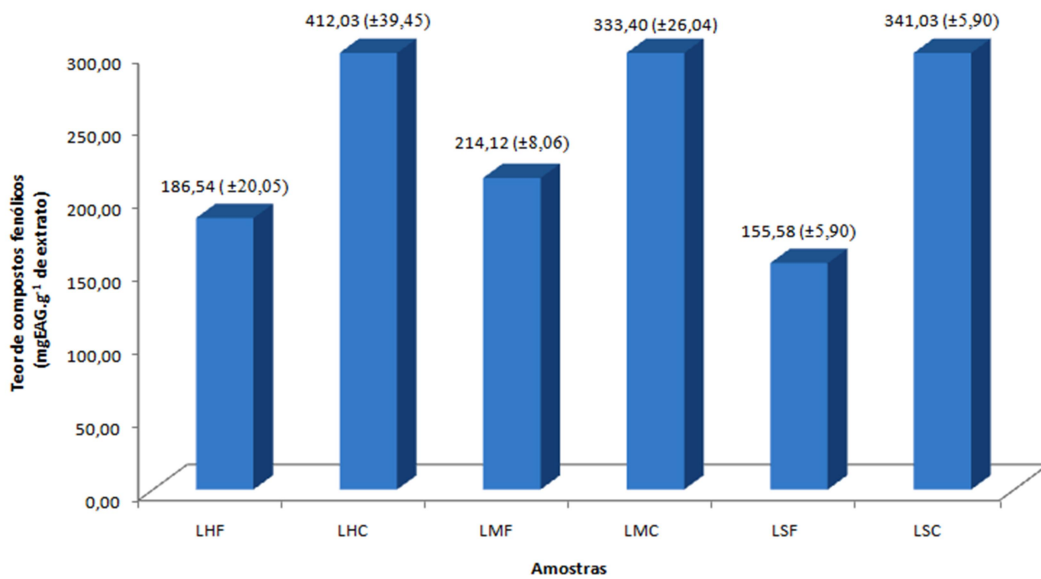


Figura 11: Gráfico comparativo entre as amostras expressando teor de compostos fenólicos totais (mg EAG . g⁻¹ de extrato).

Fonte: autor

De acordo com o gráfico, as amostras com maior teor de compostos fenólicos foram LH caules, LS caules e LM caules apresentando valores entre 341,03 ±5,90 e 412,03 ±39,45 mg EAG . g⁻¹ de extrato. Foi possível observar que as amostras obtidas a partir dos caules de espécies de *Lippia* apresentaram teores de compostos fenólicos mais altos do que das amostras obtidas através das folhas.

Embora a literatura aponte que a presença de compostos fenólicos está relacionada a uma alta atividade antioxidante, não foi possível fazer esta associação neste trabalho, já que as amostras com maior atividade antioxidante foram as obtidas a partir de folhas de *L. subracemosa* e de *L. hermanoides*.

Estes resultados indicam a presença de outros constituintes não fenólicos com potencial antioxidante nos extratos ou uma limitação do método de determinação de compostos fenólicos. Resultado semelhante foi obtido por Damasceno et al (2003) que determinou o teor de compostos fenólicos totais de frações em diclorometano e acetato de etila de *Lippia grandis*, utilizando reativo de Folin-Ciocalteu, bem como determinou sua atividade antioxidante. Estes autores observaram que a fração diclorometano do extrato apresentou maior atividade antioxidante, contrariamente a uma menor concentração de compostos fenólicos totais.

Já comparando os resultados obtidos nesse estudo com os valores encontrados para atividade antimicrobiana, merece destaque os valores obtidos para a amostra LH caules, que foi a segunda mais efetiva em inibir o crescimento dos micro-organismos testados, inclusive sendo mais ativa frente às bactérias Gram-negativas e a única a inibir o crescimento de *E.coli* CCMB 261.

Embora o método de Folin-Ciocalteu seja o mais empregado para quantificação de compostos fenólicos, ele oferece limitações. Na verdade este método mede a capacidade redutora das amostras, que não precisam ter necessariamente, natureza fenólica. Além disso, este método tende a superestimar o teor fenólico total, já que de acordo com relatos da literatura, diversos interferentes não fenólicos podem influenciar nos resultados do teste (OLIVEIRA et al, 2009; HUANG, et al, 2005; SINGLETON et al, 1999).

5.4- Flavonóides totais em espécies de *Lippia*.

Os extratos metanólicos das espécies de *Lippia* abordadas neste trabalho foram submetidos ao ensaio de quantificação de flavonóides através de método espectrofotométrico tendo como base a reação de complexação com cloreto de alumínio. Foi utilizado o flavonóide quercetina di-hidratada como padrão neste ensaio, construindo uma curva de calibração (Figura 12) representando a concentração de flavonóides totais correspondente a quercetina (eixo x) *versus* a absorbância (eixo y).

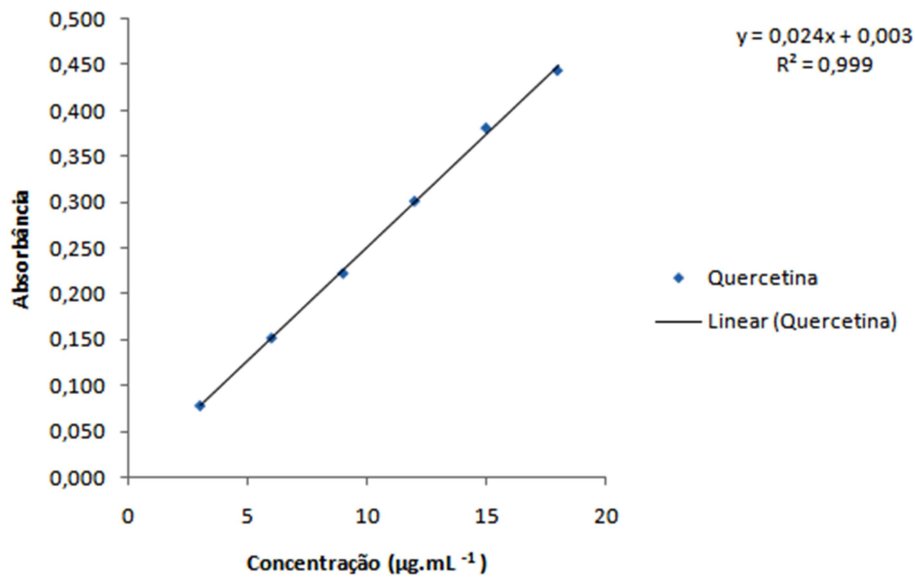


Figura 12: Curva padrão da quercetina.

Fonte: Pinto, 2011.

Os resultados obtidos para este teste foram expressos em equivalente de quercetina (EQ), o que significa que quanto maior a quantidade de quercetina encontrada por grama de extrato, maior é a quantidade de flavonóides na amostra em análise. Na Figura 13 estão expressos como médias de três etapas independentes os resultados de teor de flavonóides das amostras estudadas.

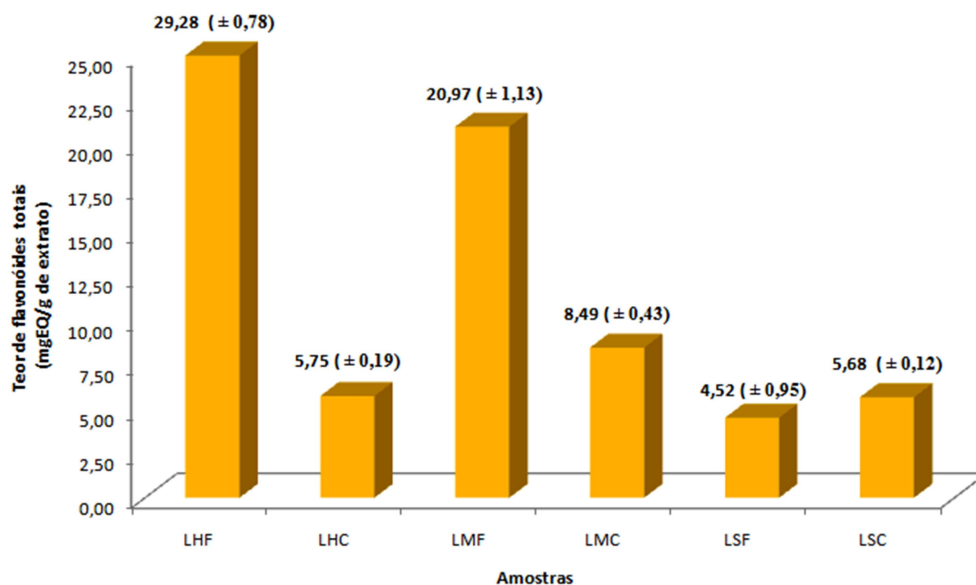


Figura 13: Gráfico comparativo entre as amostras expressando teor de flavonóides (mgEQ . g⁻¹ de extrato).

As amostras com maior teor de flavonóides foram LH folhas e LM folhas, apresentando 29,28 ($\pm 0,78$) e 20,97 ($\pm 1,13$) mgEQ . g⁻¹ de extrato, respectivamente. Para a espécie *L.subracemosa*, entretanto, praticamente não houve variação no teor de flavonóides para folhas e caules.

Foi possível estabelecer uma relação entre esses resultados e a atividade antimicrobiana detectada na amostra LM folhas, já que a mesma foi a amostra efetiva frente a um número maior de micro-organismos. No caso de *L.subracemosa*, não houve variação na ação antimicrobiana dos respectivos extratos de caule e de folhas, assim como nos teores de flavonóides. Já para *L. hermannoides*, foi possível fazer uma relação entre os valores obtidos de flavonóides para a amostra das folhas e a atividade antioxidante expressa, sendo a mesma a segunda amostra com menor valor de EC₅₀.

A literatura menciona que a concentração de flavonóides e a atividade antimicrobiana de uma espécie vegetal estão fortemente ligadas (CUSHNIE, 2005). Segundo Ferreira (2002), os principais constituintes químicos de folhas e caules de algumas espécies de *Lippia* constituem os flavonóides glicosídeos e os derivados fenilpropanóides. Embora ainda existam poucos estudos a cerca dos flavonóides presentes nesse gênero, já foram relatados como representantes mais comuns desse grupo de substâncias presentes em *Lippia*, a pinocembrina, narangina (DOMINGUEZ et al, 1989), luteolina, cismaritina e eupafolina (SKALTSA; SHAMMAS, 1988; DE VINCENZI et al, 1995). Dentre esses, a pinocembrina, narangina e luteolina já foram citados como potenciais agentes antimicrobianos por TAMIRA et al, 1994, SATO et al, 1996 e RAHUA et al, 2000.

O mecanismo de ação antimicrobiana dos flavonóides ainda não está bem esclarecido, mas sabe-se que essas substâncias escolhem diversos alvos nas células, tais como a inibição da síntese dos ácidos nucléicos e do metabolismo energético. (MIDDLETON et al, 2000; SATO et al, 1996). A literatura indica também que a atividade antimicrobiana pode estar relacionada a uma ação sinérgica entre a presença de flavonóides e outros compostos reconhecidamente agentes bactericidas (HAVSTEEN, 1983; CUSHNIE; LAMB, 2005). Existem ainda relatos de que a modificação estrutural de flavonóides naturais pode aumentar sua atividade antimicrobiana, como por exemplo, a adição de metais de transição na estrutura e a introdução dos elementos bromo (Br) e cloro (Cl) no anel B (SATO et al, 1996;

CUSHNIE; LAMB, 2005). Experimentos *in vivo* também têm demonstrado resultados satisfatórios; Vijaya et al. (1996) observou em seu experimento que a quercetina aplicada por via oral foi efetiva em proteger porcos de infecção induzida por *Shigella sp.* Já Dastidar et al. (2004) observou que a aplicação intraperitoneal de flavonóides em ratos conferiu significativa proteção frente a infecção induzida por *Salmonella typhimurium*.

Em relação aos resultados de atividade antioxidante, também foi possível estabelecer uma correlação de maneira geral, em virtude de que as amostras com melhor atividade antioxidante foram as das folhas, bem como o mesmo ocorreu para as amostras de LH folhas e LM folhas. Os flavonóides são compostos que possuem a estrutura molecular ideal para atuarem como antioxidantes, já que são muito efetivos no sequestro de radicais livres. De modo geral, quanto maior o número de hidroxilas na estrutura, maior a atividade como agente doador de H e de elétrons (ALVES et al, 2007).

Para *Lippia subracemosa* não houve diferenças significativas dos teores de flavonóides encontrados em folha e caules dessa espécie, embora a amostra LS folhas tenha mostrado melhor potencial antioxidante das espécies estudadas.

Estudos realizados com *Lippia* relacionam a atividade antioxidante dessa espécie à presença de flavonóides. Martínez-Rocha et al (2008) trabalhando com *Lippia graveolens* conseguiram identificar os flavonóides narangina e ácido rosmarinico nessa espécie. A atividade antioxidante do extrato metanólico da espécie foi avaliada pelo método do DPPH e os autores concluíram que a CE₅₀ obtida para as amostras foi próxima a encontrada para o padrão ácido gálico. Já em estudo realizado por Funes et al (2010) resultou na identificação de quatro fenilpropanóides (inclusive o verbacosideo) e três flavonas glicosiladas como constituintes majoritários do extrato etanólico dessa espécie. Os autores caracterizaram a atividade antioxidante do protoplasma de ratos após ingestão oral de extrato de *L. graveolens* e, chegaram a conclusão de que a ação antioxidante estava diretamente relacionada a concentração do verbacosideo.

Observou-se ainda, no presente trabalho, que as amostras obtidas a partir das folhas de espécies de *Lippia* apresentaram maior teor de flavonóides quando comparadas àquelas obtidas através dos caules; isso pode ser atribuído a capacidade desses compostos de proteger os vegetais contra os efeitos dos raios

ultravioleta, que são mais pronunciados nas folhas, já que estão mais expostas a esse tipo de radiação (SIMÕES et al, 2004).

6 – Considerações Finais

Este estudo permitiu verificar que espécies as espécies *L.hermanoides*, *L. morii* e *L. subracemosa* coletadas no semi-árido baiano possuem atividade antimicrobiana e antioxidante. Todas as amostras apresentaram atividade antimicrobiana frente à pelo menos um dos micro-organismos testados, com destaque para as espécies *L. hermanoides* e *L.morii*. No que se refere à atividade antioxidante as amostras de folhas dessas duas espécies também foram mais efetivas como agentes antioxidantes, seguidas pelas amostras de folhas e caules de *L.subracemosa*.

Embora não haja registros de uso destas espécies na medicina popular, outras espécies deste gênero vêm sendo utilizadas em doenças provocadas por micro-organismos e/ou relacionadas a presença de radicais livres, evidenciando a importância do gênero *Lippia* na busca de novos compostos antimicrobianos e antioxidantes.

No ensaio antimicrobiano observou-se que as bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis as amostras do que as bactérias Gram-negativas e as leveduras. O micro-organismo suscetível a um maior número de amostras foi *B.cereus* CCMB 282, embora a menor CIM encontrada nesse trabalho foi para o micro-organismo *S.aureus* CCMB 262. Destacam-se nesse estudo os resultados obtidos para a amostra obtida a partir das folhas de *L.morii* e para a obtida através dos caules de *L. hermanoides*, já que ambas impediram o crescimento de um maior número de micro-organismos. A amostra LM folhas, além de apresentar atividade frente as bactérias Gram-positivas, também foi efetiva contra uma Gram-negativa, além das duas leveduras. Dessa forma, este extrato pode ser considerado como promissor para a obtenção de compostos bioativos que possam ser utilizados diretamente no combate a doenças infecciosas ou ainda, funcionar como protótipo para fármacos com propriedades antimicrobianas.

Esta amostra também merece destaque em relação ao ensaio de atividade antioxidante, sendo uma das que apresentou menor CE₅₀. Este resultado sugere o potencial uso dessa espécie como um antioxidante natural. Ainda a respeito desses resultados, foi possível observar uma relação entre maior concentração de flavonóides e aumento da atividade antimicrobiana e antioxidante, indicando que

este grupo de metabólitos pode ter grande contribuição para as atividades biológicas observadas.

Os resultados obtidos apontam para a necessidade da ampliação desta investigação, tanto no que se refere ao espectro de amostras quanto ao aprofundamento da avaliação dos fatores responsáveis pela atividade antimicrobiana e antioxidante, prosseguindo assim com o isolamento e identificação de metabólitos destas espécies. Mesmo com a contribuição do conhecimento propiciado por este trabalho, para a confirmação de suas propriedades medicinais e considerando que estudos referentes à atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos de *Lippia* ainda são escassos, é necessário que o mesmo seja continuado e ampliado.

Referências

- ABAD, M. J. et al. Antiinflammatory activity of two flavonoids from *Tanacetum microphyllum*. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 116-1167, 1993.
- ABEGAZ, B. et al. Constituents of essential oil from wild and cultivated *Lippia adoensis* Hochst. ex. Walp. **Journal of Essential Oil Research**. v. 5, n. 5, p. 487-491, 1993.
- ADER, P. et al. Investigations on the influence of quercetin and quercetinglycosides on the Na⁺/glucose cotransporter in rat small intestine. **Proceedings of the Society of Nutrition Physiology**. n. 9, p. 129, 2000.
- ADESINA, S. K. et al. **Survey on indigenous useful plants of West Africa with special emphasis on medicinal plants and issues associated with their management**. Tokyo, Japan: United Nations University, 1993.
- ADJANOHOUN, J. E. et al. Me´decine traditionnelle et pharmacope´e contribution aux e´tudes e´tnobotaniques et floristiques au Togo apud ABENA, A. A. et al. Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of essential oil of *Lippia multiflora*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 231-236, 2003.
- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n. 1, p.114-140, Jan./Mar. 2007.
- AGUIAR, J. S.; COSTA, M. C. C. D. *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown (Verbenaceae): levantamento de publicaões nas áreas química, agronmica e farmacológica, no período de 1979 a 2004. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 8, n. 1, p. 79-84, 2005.
- ALCARAZ, L. E. et al. Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Theoretical Biology**. n. 205, p. 231-40, 2000.
- ALEA, J. A. et al. Composiion y propiedades antibacteriana de aceite essencial de *Lippia alba* (Mill). **Revista Cubana de Farmácia**, v.30,n.1, p. 29-35, 1997.
- ALVES, Clayton Queiroz et al. Avaliaion da atividade antioxidante de flavonóides. **Diálogos & Ciência**, v. 12, p. 1-8, 2007.
- ARAÚJO, C.A.C.; LEON L.L. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. vol. 96, p.723-728. 2001.
- AVANCINI, C. A. et al. Atividade bacteristtica e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less) D. C., Compositae, carqueja como desinfetante ou anti-séptico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 52, n. 3, p. 230-234, 2000.

BANOV, D. et al. Caracterização do extrato seco de *Ginkgo biloba* L. em formulações de uso tópico. **Acta Farm. Bonaerense**. v. 25, n. 2, p. 219-224, 2006.

BARA, M.T.F. et al. Determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 16, v. 2, p. 211-215, 2006.

BARATTA, M. T. et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary oregano and coriander essential oils. **Journal Essential Oil Research**, n. 10, p.618-627, 1998.

BARBOSA, F. G. **Contribuição ao conhecimento químico de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, cultivados no horto e plantas medicinais da UFC**. 280p. Tese de Doutorado em Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará, 2003.

BARILLAS, K. V. Estudio de la actividad antiinflamatoria de diversas especies de la flora de Guatemala. Facultad de Farmacia. **Memoria Doctoral**. Universidad Complutense de Madrid, 1993.

BARREIROS, A. L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-126, 2006.

BARROS, F. M. C. **Variabilidade sazonal, atividade antimicrobiana, fracionamento bio-guiado, isolamento e elucidação estrutural dos principais constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (MILL.) N. E. BROWN**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul. 2008.

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Universidade Federal de Viçosa. v. 3, p. 255, 1991.

BASSOLE, I.H.N. et al. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. **Phytochemistry**.n. 62. 2003. Disponível em: <hppt://www.elsevier.com/locate /phytochem >. Acesso: em 09 nov.2008.

BOSCOLO, O. H. et al. Potencial antioxidante de algumas plantas de restinga citadas como medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v. 9, p. 8-12, 2007.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**. London, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRANDÃO, H. N. et al. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. **Diálogos & Ciência**, n. 12, 2007.

BRASIL.Ministério da Saúde. Política Nacional de práticas integrativas e Complementares no SUS. Brasília: 2006.

BUITRON, X. et al. Plantas Medicinais do Brasil: aspectos gerais sobre legislação e comércio. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v. 10, n. 1, 2006.

C´ACERES, A. et al. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders: confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. **Journal of Ethnopharmacology**. n. 38, p. 31–38, 1993.

CALAINHO, D. B. Jesuítas e Medicina no Brasil Colonial. **Tempo**. n. 19, p. 61-65, Rio de Janeiro: 2005.

CALIXTO, J. B. Estudo etnofarmacológico pré-clínico de plantas medicinais. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. p. 77-79. Chapecó: Argos, 2001.

CAMPOS, A. D. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.39, n.7, p.637-643, 2004.

CARRARA Jr., E.; MEIRELLES, H.; **A Indústria Química e o Desenvolvimento do Brasil**. Metalivros: São Paulo, 1996.

CARVALHO, R. S. M. **Investigação da atividade farmacológica central dos extratos aquoso e hidroalcoólico, da fração butanólica e do verbascosídeo de Lippia alba. (MILLER) N. E. BROWN – Verbenaceae**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

CASTRO, P.R. **Óleos essenciais de espécies de L. (Verbenaceae) do semi-árido baiano: potencial antimicrobiano e composição química**. Monografia (Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 2005.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CESAR, A. N. et al. The chemistry of the genus *Lippia* (verbenaceae). In: KINTZIOS, S. E. (Ed). **Oregano: the genera *Origanum* and *Lippia***. British Library Cataloguing in Publication Data. 2004.

CHANH, P.H. et al. Comparative hypotensive effects of compounds extracted from *Lippia multiflora* leaves. **Planta Medica**.v. 54, p. 294–296,1988.

CHIOU, W. F. et al. Acteoside protects endothelial cells against free radical-induced oxidative stress. **Journal of Ethnopharmacology** , v.56, n.6, p.743 – 748, 2004.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition**. CLSI document M7-A6

(ISBN 1-56238-486-4). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003a.

CORDEIRO, C. E. O. **Investigação da atividade antimicrobiana e antioxidante da espécie *Cratylia hypargyrea* Martius ex. Bentham (Leguminosae)**. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009.

COSTA, S. M. O. et al. Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.12, p. 66-67. 2002.

COUTINHO, H.D.M. et al. **Atividade antimicrobiana de produtos naturais**. 2004. Disponível em: <http://www.adufpbjp.com.br/publica/conceitos/10/art_11.pdf>. Acesso em: 09 nov. 2008.

CUNHA, A. P. **Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes ativos e fitoterapia**. Escola Superior de Agricultura da universidade de São Paulo. Disponível em: http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/aspectos_historicos.pdf. Acesso em: 09 nov.2008.

CUSHNIE, T. P. et al. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**. n.26, p.343–356, 2005.

DALZIEL, J. M. **The Useful Plants of West Tropical Africa**. Crown Agents for Oversea Government and Administration. Millbank, London, 455. 1937.

DAMASCENO, E. I. T. et al. Antioxidant capacity and larvicidal activity of essential oil and extracts from *Lippia grandis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 01, 2011.

DASTIDAR, S. G. et al. Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones. **International Journal of Antimicrobial Agents**. n. 23, p.99–102, 2004.

DEVIENNE, K. F. et al. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 6, n. 3, p. 11-14, 2004.

DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Academic Press: 1997.

DE VINCENZI, M. et al. Monographs on botanical flavouring substances used in foods. Part IV. **Fitoterapia**. n.66, p. 203–210,1995.

DOMINGUEZ, S. X. et al. Chemical constituents of *Lippia graveolens*. **Planta Médica**, n. 55, p. 208-209, 1989.

DUARTE M.C.T. et al. Anti-*Candida* activity of essential oils and extracts from native and exotic medicinal plants used in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. n.97, p.305-311. 2005.

DUFFY, C. F.; POWER, R. F. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 527-529, 2001.

DWIVEDI, S. K. et al. Fungitoxicity of some essential oils against *Macrophomina phaseolina*. **Journal Indian Perfumer**. v. 34, n. 1, p. 20-21. 1990.

FARIAS, E. M. F. G. et al. Antifungal activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verdenaceae) against clinical isolates of *Candida* species. **Journal of Herbal Medicine**. v.2, n. 3, 2000.

FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.42, n. 3, p.369-374, 2006.

FERREIRA, J. L. P. et al. Variação sazonal de flavonóides e fenilpropanóides em *Lippia alba*. **XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Cuiabá, MT. CD-Rom**, 2002.

FRICKE, C. et al. Sesquiterpenes from *Lippia integrifolia* Essential Oil. **Journal of Natural Products**, v.62, p. 694-696, 1999.

FUNCH, L.S. et al. **Plantas úteis**: Chapada Diamantina. Sao Carlos: Rima, 2004.

FUNES, L. et al. Effects of verbascoside, a phenylpropanoid glycoside from lemon verbena, on phospholipid model membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.163, n. 2, 2010.

GASQUET, M. et al. Evaluation *in vitro* and *in vivo* of a traditional antimalarial, 'Malarial-5'. **Fitoterapia**, v. 64, p. 423-426, 1993.

GELFAND, M. et al. **The Traditional Medical Practitioner in Zimbabwe**. Mambo Press, Gweru, Zimbabwe, 1985.

GHAJAR, B. M. The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on permeability of *Staphylococcus aureus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 32, n. 6, p. 940-944, 1968. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/>>. Acesso em: agosto de 2010.

GHEDINI, T. L. et al. Levantamento de dados sobre plantas medicinais de uso popular no município de São João de Polêsine, RS. II - Emprego de preparações caseiras no uso medicinal. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v.5, n.1.2002.

GIRÃO, V. C. C. et al. Efeito protetor do extrato etanólico de *Lippia sidoides* (alecrim pimenta) nas gengivites marginais de cães. **Ciência Animal**. v. 11, n. 1, p. 13-16, 2001.

GOVERE, J. et al. Local plants as repellents against *Anopheles arabiensis* in Mpumalanga Province South Africa. **Central Afr. J. Med.** n.46, p. 213–216, 2000.
HELFAND, W. H.; COWEN, D. L. **Pharmacy – an illustrated history** New York. 1990.

GUERECA, M.C.G. et al. Flavonoides contenidos em tallos de orégano (*Lippia graveolens* H.B.K. f. *berlandieri* SCHAUER.) con propiedades antiinflamatorias. Instituto Politécnico Nacional. 3^a Reunion Nacional sobre Oregano, 2008.

GREENHAM, J. B. et al. Identification of lipophilic flavones and flavonols by comparative HPLC, TLC and UV spectral analysis. **Phytochemical Analysis**, v. 14, p. 100–118, 2003.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual review of nutrition**, v.16, p.33-50. 1996.

HAVSTEEN B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**. n.32, p. 1141–1148, 1983.

HEIM, K. E. et al. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, n. 13, p. 572–584, 2002.

HOLETZ, F.B. et al. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.97, p.1-5, 2002.

HUANG, D. et al. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUTCHINGS, A. **Zulu Medicinal Plants**. Natal University Press, Pietermaritzburg, 1996.

JAHODAR, L. et al. Atividade anti-microbiana da arbutina e de extratos das folhas de *Arctostaphylos uva-ursi* in vitro. **Phytochemistry**. v. 5, p. 174-178, 1997.

JULIANI, H.R. et al. Essential oils from various plant parts of *Lippia junelliana*. **Ann. Soc. Quim. Argent.** n. 82, p.53–55, 1996.

JULIANI, H. R. et al. Intraespecific variation in leaf oils of *Lippia Junelliana* (mold.) tronc. **Biochemical Systematics and Ecology**. n. 30, p. 163-170, 2002.

JULIÃO, L. S. et al. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. (erva-cidreira). **Revista Brasileira de Farmacognosia**.v.13, 2003.

LEITÃO-FILHO, H. F. et al. Utilização de estruturas secretoras na identificação dos gêneros de Asteraceae de uma vegetação do cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 20, p. 163-164, 1997.

LEUNG, A.Y.; FOSTER, S. Oregano. In: LEUNG, A.Y.; FOSTER, S. (Eds.), **Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics**. 2. ed. Wiley, New York, p. 398–400, 1996.

LIN, L. Z. et al. A screening method for the systematic identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, submitted for publication, 2007.

LIU, M. et al. The effects of verbascoside on plasma lipid peroxidation level and erythrocyte membrane fluidity during immobilization in rabbits: a time course study. **Life Science**., v.73, p.883 – 892, 2003.

KOUMAGLO, K.H. et al. Geraniol and nerol major constituents of *Lippia multiflora* moldenke leaf oil. **Journal of Essential Oil Research**. n. 8, p. 237– 240, 1996.

MALE, O. Enhancement of the antimycetic effectiveness of Griseo-Fulvin by dimethyl sulfoxide *in vitro*. **Arch. Klin. Exp. Dermatol.** v. 223, p.63-76, 1968.

MANTOVANI, D.; PORCU, O. P. Avaliação fitoquímica do extrato de *Lippia alba* para utilização como antioxidante natural em alimentos. **Revista Tecnológica**, v. 18, p. 69-74, 2009.

MARTÍNEZ-ROSA, A. et al. Antioxidant and Antimutagenic Activities of Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth). **Plant Foods Human Nutrition**, n. 63, p. 1-5, 2008.

MATOS, F. J. A. As ervas-cidreira do Nordeste do Brasil: estudo de três quimiotipos de *Lippia Alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.77, n.4, p.137-41,1996.

MATOS, F. J. A. et al. Medicinal plants of Northeast Brazil containing thymol and carvacrol- *Lippia sidoides* Cham. and *Lippia gracilis* H. B. K. (Verbenaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, n. 6, 1999.

MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais**. 2 ed. Imprensa Universitária, p. 344, Fortaleza, 2000.

MELVILLE, K.I. et al. Effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on cardiovascular responses to Quabain. Proscillaridin and Digitoxin. **Archive International Pharmacodynamic**, v.174, p. 277-293, 1968.

MEVY, J. P. et al. Chemical composition and some biological activities of the volatile oils of a chemotype of *Lippia chevalieri* Moldenke. **Food Chemistry** n.101, p. 682– 685, 2007.

MIDDLETON, R. E. et al. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**. n. 52, p.673–751, 2000.

MING, L. C. **Influência de diferentes níveis de adubação orgânica na produção de biomassa e teor de óleos essenciais de *L. alba* (Verbenaceae)**. (Tese de mestrado), p. 206, Curitiba: 1992.

MONTEIRO, M. V. B. et al. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *L. sidoides* Cham. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 10. 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 10 nov. 2008.

MORAIS, S. M. et al. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. n.15, p.169-177, 2005.

NEVES, I. A. **Composição química do óleo das folhas de *Lippia gracilis* Schauer de duas localidades de Pernambuco**. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). 30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2001.

NOGUEIRA, M. A. et al. Caracterização química e atividade biológica do óleo essencial de *Lippia alba* cultivada no Paraná. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 28, n.3, p. 273 - 278, 2007.

NUNES, R. S. et al. **Scientia Plena** v.1, n.7, p. 182-184, 2005.

OLADIMEJI, F. A. et al. Pediculocidal and scabidical properties of *Lippia multiflora* essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**. n.72, p.305– 311, 2000.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 05, n. 06, p. 1-14, 2009.

OLIVEIRA, D. R. et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. **Food Chemistry**. v.101, n. 1, p. 236-240, 2007.

OLIVEIRA, D. R. **Levantamento Etnobotânico das Plantas Medicinais Utilizadas pela Comunidade de Oriximiná (Pará) com enfoque etnofarmacológico para o gênero *Lippia***. Master Thesis. Rio de Janeiro: UFRJ/NPPN, p. 111, 2004.

OLIVIER, D. K. et al. Phenylethanoid glycosides from *Lippia javanica*. **South Africa Journal of Botany**. v. 76, n. 1, p. 58-63, 2010. Disponível em:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii>>. Acesso em: agosto de 2010.

PARKY, D. C. **Great moments in pharmacy**. Detroit: Northwood Institute Press, 1966.

PASCUAL, M.E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.

PELLISSIER, Y. et al. A chemical, bacteriological, toxicological and clinical study of the essential oil of *Lippia multiflora* Mold. (Verbenaceae). **Journal of Essential Oil Research**. n. 6, p. 623- 630, 1994.

PENNACCHIO, M. et al. The effect of verbascoside on cyclic 3',5'-adenosine monophosphate levels in isolated rat heart. **European Journal of Pharmacology.**, v.305, p.169 – 171, 1996.

PERES, M. T. L. P. et al. Estudos químicos e biológicos de *Microgramma vacciniifolia* (LANGSD. & FISCH.) COPEL (Polypodiaceae). **Química Nova**. V. 32, n. 4, p. 897-901, 2009.

P'ERZ, M. S. et al. Anti-inflammatory activity of *L. dulcis*. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 102. 2005. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/jethpharm>>. Acesso em: 10 nov. 2008.

PESSOA, O. D. L. Antibacterial activity of the essential oil from *Lippia gracillis*. **Fitoterapia**. n.76, p. 712–714, 2005.

PINTO, A. C. et al. Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25. 2002.

PINTO, C. P. **Atividade antimicrobiana e perfil químico de espécies do gênero *Lippia* do semiárido da Bahia**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana. Bahia: 2008.

PROESTOS, C. et al. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. **Food Chemistry**. v. 95, p.44-52, 2006.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino da farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 2, p. 57-69. 2001.

RAUHA, J. P. et al. Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**. n. 56, p.03–12, 2000.

RIBEIRO, M.G. et al. Dimetilsulfóxido-DMSO no teste de sensibilidade microbiana *in vitro* em cepas de *Rhodococcus equi* isoladas de afecções pulmonares em potros. **Ciência Rural**, v.31, n.5, p. 889-892, 2001.

RICE-EVANS, C. A. et al. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 20, n. 8, p. 933-956, 1996.

ROCHA-GUZMÁN, N. E. Antioxidant effect of oregano (*Lippia berlandieri*) essential oil and mother liquors. **Food Chemistry**. v. 102, p. 330-335, 2007

RODOLFO, J. M. et al. Intraspecific variation in quality control parameters, polyphenol profile, and antioxidant activity in wild populations of *Lippia multiflora* from Ghana, **American Chemical Society n.925**, p. 126–142, 2006.

ROSEN, H. et al. Dimethyl sulfoxide (DMSO) as a solvent in acute toxicity determinations. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 120, p. 511-514, 1965.

ROSSATO, et al. Avaliação do óleo essencial de *Aloysia sellowii* (BRIQUET) MOLDENKE (VERBENACEAE) do sul do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 200-202, 2006.

SALIMENTA, F. R. G. **Novos sinônimos e tipificação em *Lippia* L. sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae)**. Instituto de Biociências da USP. Departamento de Botânica. 2002.

SANTOS, M. A. C.; ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na seleção de espécies de plantas medicinais para triagem de atividade antitumoral. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 2, p. 7-17, 1999.

SANTOS, M. M. F.B. **Efeito de extratos de duas formas de *Lippia alba* sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz), isolado de *Citrus sp.*** Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. São Paulo: 1996.

SATO, M. et al. Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**. n.54, p.171–176, 1996.

SCHAPOVAL, E.E.S. et al. Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.60, p.53 – 59, 1998.

SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal Proteins. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p.506-509, 2006.

SENA-FILHO, J. G. et al. Atividade antimicrobiana e perfil fitoquímico das raízes de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n. 4, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102>>. Acesso em: dezembro de 2010.

SHALE, T. L. et al. Screening of medicinal plants used in Lesotho for anti-bacterial and anti inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 67, p.347-354.1999.

SKALTSA, H.; SHAMMAS, G. Flavonoids from *Lippia citriodora*. **Planta Médica**, v. 54, n. 5, p. 465, 1988.

SINGH, G. et al. Chemical constituents and antifungal activity of *Lippia alba* Mill. leaf essential oil. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Science**. v. 22, n. 1, p. 701-703, 2000.

SILVA, M. I. G. **Utilização de Fitoterápicos na Unidades Básicas de Atenção à Saúde da Família no Município de Maracanaú – Ceará**. (Dissertação de Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

- SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da UFSC, 2004.
- SMITH, C.A. Common Names of South African Plants. **Memoirs of the Botanical Survey of South Africa** n. 35, 1966.
- SINGLETON, V. L. et al. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzimology**, v. 299, p. 178-184, 1999.
- SOARES, L.C. **Estudo tecnológico, fitoquímico e biológico de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown ext Britt & Wils. (falsa melissa) Verbenaceae**. 112p. Dissertação de Mestrado em Farmácia. Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.
- SOARES, L. C. et al. Obtenção de bebida a partir de suco de caju (*Anacardium occidentale*, L) e extrato de guaraná (*Paullinia cupana* sorbilis Mart.Ducke). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 23, n. 2, p. 387-389, 2001.
- SOUTO-BACHILLER, F.A. et al. Terpenoid composition of *Lippia dulcis*. **Phytochemistry**. v. 44, n. 6, p. 1077-1086, 1997.
- SOUZA, T.J.T.et al. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 17, p. 368-372.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: São Paulo, 2005.
- STANI, A.C. et al. Linalool from *Lippia alba*: study of the reproducibility of the essential oil profile and the enantiomeric purity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v.50, p. 3518- 3521, 2002.
- STASI, L. C. (Org). **Plantas Medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996.
- TADEG, H. et al. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 168-175, 2005.
- TAGAMI, O. K. et al. Fungitoxidade de *Bidens pilosa*, *Thymus vulgaris*, *Lippia alba* e *Rosmarinus officinalis* no desenvolvimento *in vitro* de fungos fitopatogênicos. **Ciências Agrárias**, v. 30, n. 2, p. 285-294.2009.

TANIRA, M. O. et al. Antimicrobial and phytochemical screening of medicinal plants of the United Arab Emirates. **Journal of ethnopharmacology**, v. 41, n. 3, p. 201, 1994.

TAVARES, E. S. et al. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *L. alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n.15, p. 1-5, 2005.

TAVARES, W. Introdução ao estudo dos antimicrobianos. In: TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

TEIXEIRA, P. C. **Do herbalismo tribal aos remédios florais do Dr. Bach**. São José do Rio Preto: São José, 1994.

TERBLANCHE', F.C., KORNELIUS, G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae)-A literature review. **Journal of Essential Oil Research**. n. 8, p. 471-485.1996.

TSUCHIYA, H. et al. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**. n. 50, p. 27-34, 1996.

VAN WYK, B. E. et al. **Medicinal Plants of South Africa**. Briza Publications, Pretoria.1997.

VERA, J. R. et al. Actividad antimicrobiana in vitro de volátiles y no volátiles de *Lippia alba* y extractos orgânicos y acuoso de *Justicia pectoralis* cultivadas em diferentes pisos termicos del departamento del Tolima. **Scientia et Technica**. n.33, p. 344-348, 2007.

VIANA, G.S.B. et al. Analgesic and antiinflamatory effects of two chemotypes of *Lippia alba*: a comparative study. **Pharmaceutical Biology**, v.36, n.5, p.347-51, 1998.

VIJAVA, K. A.; ANANTHAN, S. Therapeutic efficacy of medicinal plants against experimentally induced shigellosis in guinea pigs. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**. n. 58, p. 191-193, 1996.

YAMADA, C. S. B. Fitoterapia: sua história e importância. **Revista Racine**. v. 43, p. 50-51, 1998.

YEN, G. G. et al. Propriedades antioxidants e pró-oxidantes de diversos chás. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 45, p. 30-34, 1997.

WARD, F. E. et al. Antimicrobial 3-methylene flavanones. **Journal of Medical Chemistry**. n.24, p. 1073-1077, 1981.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer Verlag, 1995.

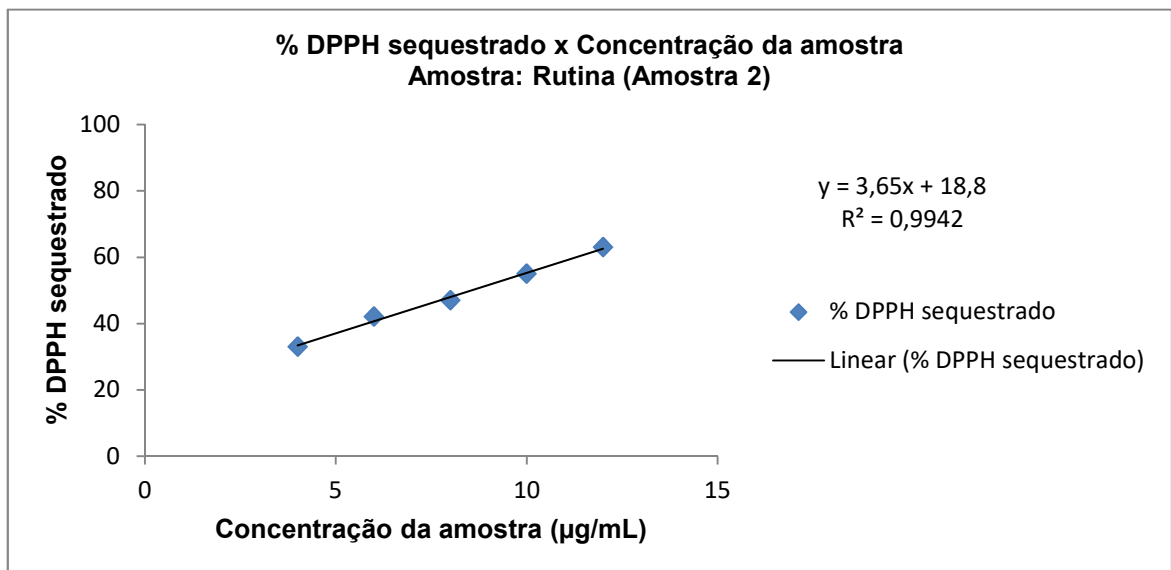
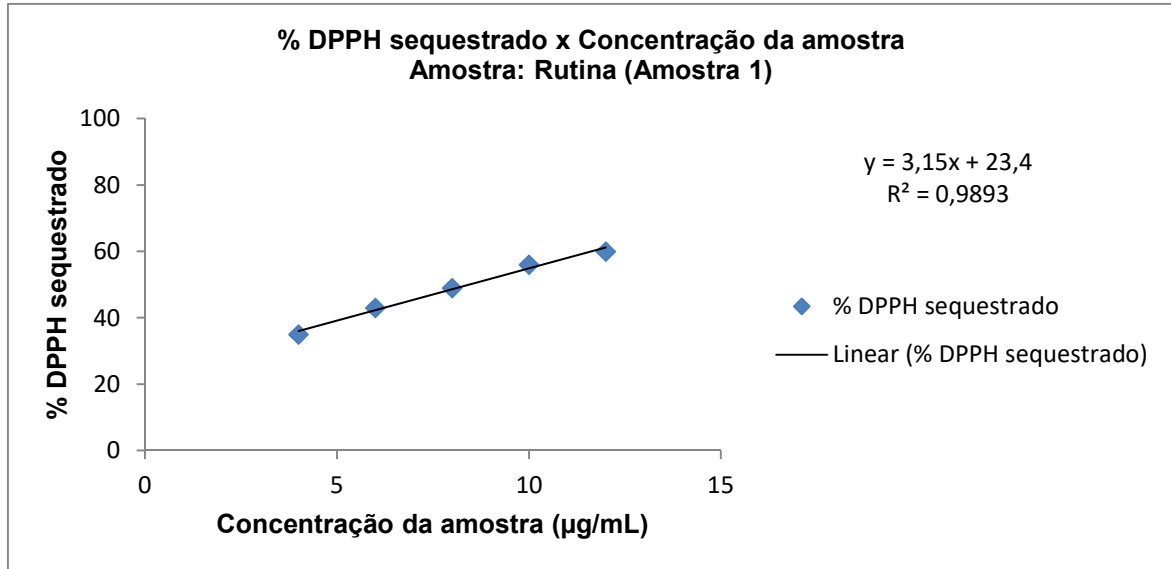
WATT, J.M.; BREYER-BRANDWIJK, M.G. **The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa**. 2.ed. Livingstone, London, 1962.

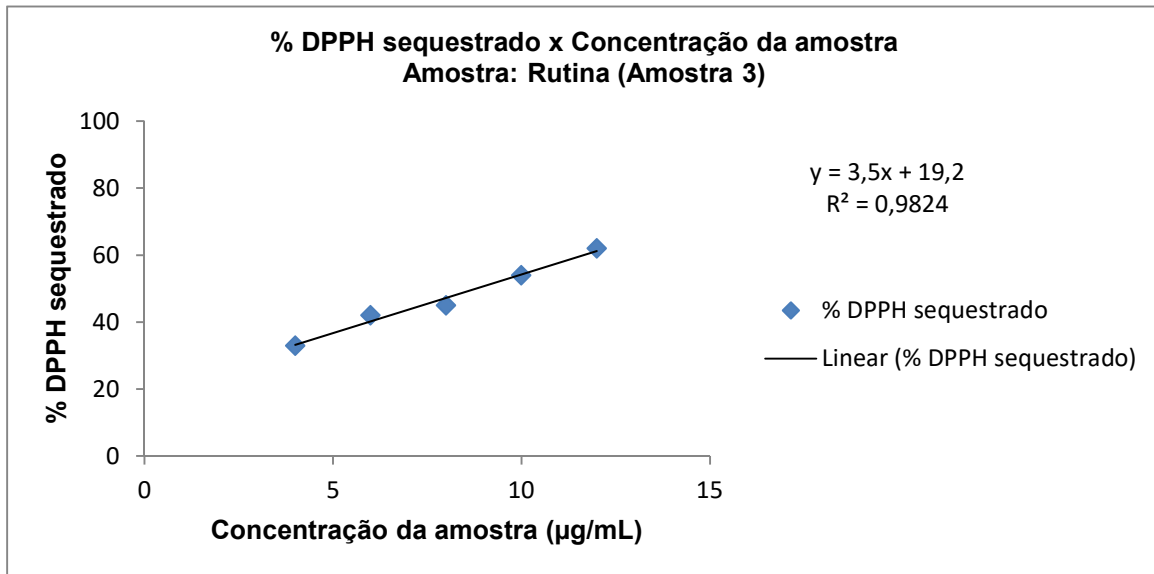
WOISKY, R. G. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. São Paulo. 1996. 74 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.

WONG, I. Y. F. et al. Antioxidative activities of phenylethanoid glycosides from *Ligustrum purpurascens*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v.49, p.3113 – 3119, 2001.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÔES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS. p. 577-614, 2003.

APÊNDICE A- Gráficos referentes ao teste de atividade antioxidante com ajuste linear para a rutina.





Anexo A - Rendimentos dos extratos metanólicos das espécies de *Lippia*.**Tabela 3:** Rendimentos (%) dos extratos metanólicos obtidos de folhas e caules das espécies de *Lippia* estudadas.

AMOSTRA	LH	LM	LS
FOLHA	13%	18%	22%
CAULE	6%	7%	34%

LH: *L. hermanoides*, LM: *L. morii*, LS: *L. subrasemosa*..

Fonte: Pinto, 2008.