



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



PPGBIOTEC

LARA RAISA CHELES VIEIRA

**DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA
MÍNIMA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia origanoides*
KUNTH TRATADOS COM DIFERENTES
REGULADORES DE METABOLISMO VEGETAL**

Feira de Santana, BA.
2013

LARA RAISA CHELES VIEIRA

**DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA
MÍNIMA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia origanóides*
KUNTH TRATADOS COM DIFERENTES
REGULADORES DE METABOLISMO VEGETAL**

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 Dr^ª Ana Paula Trovatti Uetanabaro
Co-orientadores: Prof^ª Dr^ª Angélica Maria Lucchese,
Me Jacqueline Miranda Gonçalves

Feira de Santana, BA.
2013

Aos meus pais, Julieta Cheles e José Manoel.

AGRADECIMENTOS

Para a realização desta dissertação, pude contar com várias pessoas importantes. E a essas pessoas prestarei os mais sinceros agradecimentos:

Aos meus pais, à minha irmã Verônica Cheles e ao meu cunhado Roniere Lima, pelo suporte nos momentos mais difíceis, sua ajuda me deu confiança para superar as barreiras encontradas durante o percurso.

À Professora Doutora Ana Paula Trovatti Uetanabaro, orientadora deste trabalho, pelos seus conhecimentos, atenção e boa vontade.

À professora Doutora Angélica Luchese, pela co-orientação e pelo apoio.

Ao Professor Doutor Roberto Tarazi, por dividir seu vasto conhecimento em estatística com uma leiga na área.

Às Mestres Jaqueline Miranda Gonçalves e Gabriela Carinhanha pela grande colaboração, sem a qual a realização desse trabalho não seria possível.

“À árvore nascente aguarda-te a bondade e a tolerância para que te possa ofertar os próprios frutos em tempo certo.”

Chico Xavier

RESUMO

O uso de extratos vegetais e fitoquímicos com finalidade medicinal é uma das mais antigas formas de aplicação medicinal da humanidade, e atualmente, a utilização de medicamentos fitoterápicos tem aumentado na população brasileira. Considerando a utilização popular de *Lippia origanoides* no tratamento de doenças respiratórias e gastrointestinais e a ação antisséptica de seu óleo essencial, o presente trabalho teve como objetivo testar, por meio do Concentração Inibitória Mínima e Concentração Microbicida Mínima, a atividade antimicrobiana, dos óleos essenciais de *L. origanoides* resultantes de plantas após tratamentos com os reguladores do metabolismo vegetal: ácido acetilsalicílico, ácido jasmônico, 6-benzilaminopurina, ácido giberélico, Stimulate® e água destilada (controle), dando continuidade a um trabalho anterior de nosso grupo. Os resultados relativos ao potencial antimicrobiano da espécie estudada variaram de acordo com o tratamento recebido, período de coleta e o micro-organismo testados. Em geral, os 12 óleos essenciais testados apresentaram atividade contra os sete micro-organismos teste utilizados. Os óleos resultantes do tratamento com ácido acetilsalicílico, ácido jasmônico e ácido giberélico apresentaram valores de MIC consideravelmente baixos, evidenciando a alta eficácia dos mesmos, sendo evidente que a época de coleta das amostras interferiu nestes resultados. Os óleos resultantes da primeira coleta de plantas foram, em geral, mais eficientes que os da terceira. Houve diferença significativa entre os valores de MIC para as cepas de *C. albicans* CCMB 266 e CCMB 286, sendo a última mais sensível aos óleos de ambos os períodos de coleta.

Palavras Chave: Ação Antimicrobiana, Fitoterapia, Semiárido, *Lippia origanoides*.

ABSTRACT

The use of plant extracts and phytochemicals with medicinal purpose is one of the oldest forms of medical applications of humanity, and currently, the use of herbal medicines has increased in population. Considering the popular use of *Lippia organoides* in the treatment of respiratory and gastrointestinal diseases and antiseptic action of its essential oil, this study aimed to test, through of the Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Microbicidal Concentration, the antimicrobial activity of the essential oils of *L. organoides* resulting from plants after treatment with plant metabolism regulators: acetylsalicylic acid, jasmonic acid, 6-benzylaminopurine, gibberellic acid, Stimulate ® and distilled water (control), continuing earlier work by our group. The results for the antimicrobial activity of the studied species varied according to the treatment received, collection period and the microorganism tested. In general, the 12 essential oils tested showed activity against the seven test microorganisms used. Oils resulting from treatment with acetylsalicylic acid, jasmonic acid and gibberellic acid had significantly lower MIC values, highlighting their high efficacy; being evident that the time for collecting the samples interfered in these results. The oil resulting from the first collection of plants were in general more efficient than the third. There was significant difference between the MIC values for strains of *C. albicans* CCMB 266 and CCMB 286, the latter being more sensitive to the oils from both collection periods.

Keywords: Antimicrobial Action, Phytotherapy, Semiarid, *Lippia organoides*.

LISTA DE SIGLAS

AAS – Ácido Acetilsalicílico

AJ – Ácido Jasmônico

ANOVA – Análise de Variância

BAP – 6-Benzilaminopurina

CCMB – Coleção de Culturas de Micro-organismos da Bahia

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

GA₃ – Ácido Giberélico

H₂O – Água

MIC/CIM – Minimum Inibitory Concentration/Concentração Inibitória Mínima

MMC/CMM – Minimum Microbicidal Concentration/ Concentração Inibitória Mínima

LAPEM – Laboratório de Pesquisa em Microbiologia

OMS – Organização Mundial de Saúde

PPGRGV – Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

STM – Stimulate

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Estrutura molecular do timol e do carvacrol.....	24
Figura 2 Plantas de <i>Lippia origanoides</i> da coleção de plantas aromáticas da Unidade Experimental Horto Florestal – UEFS.	24
Figura 3 Esquema da placa de 96 poços para determinação da CIM.	26
Figura 4 Esquema da execução da diluição seriada para a determinação da Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais das folhas e inflorescências de <i>Lippia origanoides</i> Kunth.....	29
Figura 5 Observação das artemias em lupa estereoscópica.....	31
Figura 6 Placa de determinação da concentração inibitória mínima, representando a diluição em série do óleo essencial da folha de <i>Lippia origanoides</i> Kunth.	33
Figura 7 Análise de variância dos valores de MIC em relação aos óleos essenciais de <i>Lippia origanoides</i> obtidos após tratamento com agentes reguladores do metabolismo vegetal e água, da primeira e terceira coletas.	35
Figura 8 Análise de variância dos valores de MIC em relação aos micro-organismos testados com os óleos essenciais de <i>Lippia origanoides</i> obtidos após tratamento com agentes reguladores do metabolismo vegetal e água, da primeira e terceira coletas.	36
Figura 9 Análise de variância dos valores de MIC em relação ao período de coleta das plantas após tratamento com agentes reguladores do metabolismo vegetal e água, da primeira e terceira coletas.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Concentração dos óleos testados extraídos das plantas da primeira e terceira coletas de folhas e inflorescências de *Lippia origanoides* após tratamento com hormônios reguladores do metabolismo vegetal e água de acordo com o micro-organismo testado. 28

Tabela 2 Concentrações Inibitórias Mínimas ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) dos óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth, resultantes das plantas da primeira e terceira coletas após tratamentos com diferentes compostos reguladores do metabolismo vegetal. 33

Tabela 3 Concentrações Microbidas Mínimas ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) dos óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth, resultantes das plantas da primeira e terceira coletas após tratamentos com diferentes compostos reguladores do metabolismo vegetal. 37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVOS	15
1.1.1 Objetivos Gerais	15
1.1.2 Objetivos Específicos	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL: CONTEXTO HISTÓRICO E UTILIZAÇÃO	16
2.2 A FAMÍLIA VERBENACEAE NA MEDICINA TRADICIONAL	19
2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	20
2.3.1 Timol e Carvacrol	23
3 METODOLOGIA	26
3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS	26
3.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	27
3.2.1 Micro-organismos Teste	29
3.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	29
3.2.3 Avaliação da Atividade Citotóxica	31
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM/MIC) E PELA CONCENTRAÇÃO MICROBICIDA MÍNIMA (CMM).....	33
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA	40
CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43
ANEXO	50

1 INTRODUÇÃO

As plantas sempre desempenharam um papel de grande importância para a humanidade, sejam para a produção de alimentos para homens e animais, abrigos, roupas, fertilizantes, aromas e fragrâncias, ou para o tratamento de suas doenças. As mesmas têm sido a base de sofisticados sistemas de medicina tradicionais existentes há milhares de anos e que continuam a dar à humanidade novos medicamentos (GURIB-FAKIM, 2006).

Conforme relatado pelos autores Almeida e colaboradores (2005), Berlin e Berlin (2005), Johnson (2006) e Albuquerque (2010) o conhecimento sobre plantas medicinais de uma dada sociedade reflete as condições específicas do lugar e do tempo, devido à interação e complexidade de fatores sociocultural, ecológico e/ou ambiental, epidemiológico e cognitivo. De fato, esse conhecimento etnofarmacológico acumulado ao longo de gerações tem servido como base para o desenvolvimento de fármacos de grande importância, tais como: digoxina, quinina, morfina, ácido salicílico e artemisina (JÚNIOR, LADIO e ALBUQUERQUE, 2011).

Segundo Gurib-Fakim (2006), os primeiros registros do uso de plantas medicinais escritos datam de cerca de 2600 a.C. na Mesopotâmia, entre as substâncias utilizadas estavam os óleos de espécies *Cedrus* (cedro) e *Cupressus sempervirens* (Cipreste), *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz), espécies de *Commiphora* (Mirra) e *Papaver somniferum* (papoula), todos ainda em uso hoje para o tratamento de doenças que variam de tosses e resfriados a infecções parasitárias e inflamação.

Atualmente, os fitoterápicos constituem importante fonte de inovação em saúde, sendo objeto de interesse e fator de competitividade do complexo produtivo da saúde (BRASIL, 2006). Durante os últimos 40 anos, pelo menos uma dúzia de drogas potentes foram derivadas de plantas com flores, incluindo reserpina e outros alcalóides anti-hipertensivos e tranquilizantes derivados das espécies de *Rauwolfia*. Um quarto de todas as prescrições médicas é composto de formulações à base de substâncias derivadas de plantas ou de análogos sintéticos derivados de plantas e, de acordo com a OMS, 80% da população mundial, principalmente os de países em desenvolvimento, dependem de medicamentos derivados de plantas para a sua saúde (GURIB-FAKIM, 2006). Além disso, o desenvolvimento do setor de plantas medicinais e de fitoterápicos pode se configurar como importante estratégia para o enfrentamento das desigualdades regionais existentes em todo mundo, podendo prover a necessária oportunidade de inserção socioeconômica das populações de territórios caracterizados pelo baixo dinamismo econômico e indicadores sociais precários (BRASIL, 2006).

Planta medicinal é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS), através da R.D.C. 48 publicada em 16 de março de 2004, como *qualquer planta que possua em um ou em vários de seus órgãos, substâncias usadas com finalidade terapêutica, ou que estas substâncias sejam ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos. A estas substâncias é dado o nome de princípios ativos* (BRASIL, 2004).

Os compostos presentes em plantas medicinais responsáveis pela ação terapêutica resultam do seu metabolismo secundário. Embora este nem sempre seja necessário para que uma planta complete seu ciclo de vida, ele desempenha um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente. Desse modo, produtos secundários atuam contra fatores bióticos como a herbivoria, ataque de patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de semente e micro-organismos simbiotes. Contudo, produtos secundários também possuem ação protetora em relação a estresses abióticos, como aqueles associados com mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição à UV e deficiência de nutrientes minerais (PERES, 2008).

O Brasil é detentor de rica diversidade cultural e étnica que resultou em um acúmulo considerável de conhecimentos e tecnologias tradicionais, passados de geração a geração, entre os quais se destaca os conhecimentos sobre manejo e uso de plantas medicinais. Além disso, é o país que detém a maior parcela da biodiversidade mundial, em torno de 15 a 20%, com destaque para as plantas superiores, nas quais detém aproximadamente 24% da biodiversidade (BRASIL, 2006).

Veiga Júnior e colaboradores (2005) relatam que no Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas. Muitas vezes essas plantas são empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas. A toxicidade de plantas medicinais e dos fitoterápicos pode parecer trivial quando comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais. Isto, entretanto, segundo esses autores não é verdade e pode ser considerado um problema sério de saúde pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, identificação errônea da planta (pelo comerciante e pelo fornecedor), possibilidades de adulteração, interações entre plantas medicinais e medicamentos alopáticos, efeitos de superdosagens, reações alérgicas ou tóxicas ocorrem com frequência.

A região do semiárido brasileiro corresponde basicamente à delimitação do bioma das caatingas e está em grande parte incluída no Nordeste do país, compreendendo 969.589,4 km² e reunindo 1.113 municípios dos Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (BRASIL, 2005). A caatinga é o único

bioma exclusivamente brasileiro, isto significa que grande parte do patrimônio biológico dessa região não é encontrada em outro lugar do mundo além de no Nordeste do Brasil. No entanto, poucos trabalhos são desenvolvidos, principalmente estudos químicos e farmacológicos das espécies encontradas, sendo a Floresta Amazônica e a Mata Atlântica, os biomas mais conhecidos e discutidos do ponto de vista da sua biodiversidade.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana, através das Concentrações Inibitórias e Microbidas Mínimas de óleos essenciais da espécie *Lippia origanoides* Kunth, encontrada no semiárido do estado da Bahia, tratadas com compostos reguladores do crescimento vegetal.

1.1.2 Específicos

- I. Verificar o potencial antimicrobiano de óleos essenciais obtidos a partir das folhas e inflorescências de *Lippia origanoides* de plantas tratadas com ácido acetilsalicílico (AAS); ácido jasmônico (AJ); 6-benzilaminopurina (BAP); ácido giberélico (GA₃); água destilada (H₂O) e o composto comercial Stimulate[®] (STM), por meio da determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e da determinação de concentração microbida mínima (MMC), contra bactérias e leveduras patogênicas ao homem;
- II. Relacionar a atividade antimicrobiana encontrada no MIC e MMC aos óleos essenciais resultantes dos tratamentos com os compostos reguladores do crescimento vegetal.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

As plantas têm provido o homem com todas as suas necessidades em termos de abrigo, roupas, alimentos, aromas e fragrâncias, além de medicamentos. Têm sido a base de sofisticados sistemas de medicina tradicional entre os quais estão Ayurveda, Unani, chinês, entre outros. Estes sistemas de medicina deram origem a algumas das drogas importantes ainda em uso hoje (GURIB-FAKIM, 2006).

2.1 PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL: CONTEXTO HISTÓRICO E UTILIZAÇÃO

Plantas medicinais tradicionais, também conhecidas como medicamentos botânicos ou fitoterápicos, referem-se aos medicamentos produtos de raízes, caules, folhas, cascas, sementes, frutos e flores que podem ser usadas para promover a saúde geral e tratar doenças (TANG e HALLIWELL, 2010). Podem ser classificadas por categorias, de acordo com sua ação sobre o organismo: estimulantes, coagulantes, diuréticas, sudoríferas, hipotensoras, de função reguladora intestinal, coletérica, depurativas, remineralizantes e reconstituintes (LORENZI e MATOS, 2002).

A descoberta humana das propriedades úteis ou nocivas dos vegetais tem suas raízes no conhecimento empírico. A observação do comportamento dos animais e a verificação empírica dos efeitos da ingestão deste ou daquele vegetal no organismo humano teve um importante papel (GOFF, 1997). Acredita-se que o conhecimento de ervas medicinais em culturas tradicionais tenha sido desenvolvido por meio de tentativa e erro ao longo de muitos séculos, e que as curas mais importantes foram verbalmente transmitidas de uma geração para outra. Assim, a medicina alopática moderna tem sua origem na medicina antiga, e é provável que muitos novos medicamentos serão descobertos e comercializados no futuro seguindo as pistas fornecidas pelo conhecimento e experiência tradicionais (GURIB-FAKIM, 2006).

A utilização de recursos naturais provavelmente antecede o *Homo sapiens* moderno. Evidências encontradas em escavações do Paleolítico mostram que o conhecimento das plantas medicinais existe há pelo menos 60.000 anos (SUMNER, 2000). Arqueólogos encontraram pólen e fragmentos de flores de diversas plantas medicinais no sítio arqueológico do homem de Neandertal no Iraque. *Ephedra*, *Centaurea*, *Senecio*, *Athea* e *Achillea* estavam entre as espécies identificadas, comprovando o uso de várias plantas pelos antepassados (TYLER et al., 1988).

Teofrasto (371-287 a.C.), considerado o “pai da botânica”, foi estudante de Platão e escreveu extensivamente sobre plantas. Ele determinou as peculiaridades e qualidades médicas das ervas, observando cuidadosamente os aspectos farmacêuticos e farmacológicos da mirra, do incenso, da cássia, mentrasto, da beladona, do timo, etc. Seu trabalho *Historia Plantarum* englobava a coleta e o preparo de plantas medicinais, condimentos e perfumes e com isso foi utilizado como uma confiável fonte de referência durante 2000 anos (SUMNER, 2000).

Segundo Calixto (2000) e Bieski (2005) até meados do século XX, as plantas medicinais e seus derivados constituíam a base da terapêutica medicamentosa, quando a síntese química, que teve início no final do século XIX, iniciou uma fase de desenvolvimento vertiginosa representada pelo avanço dos antibióticos e da vacinação em massa. Nos anos 80, o desenvolvimento da pesquisa científica resultou na identificação de 121 compostos de origem vegetal, provenientes de 95 espécies de plantas. Grande parte deles está incluída na atual terapêutica dos países ocidentais. No período 1983-1994, 6% dos medicamentos aprovados foram extraídos diretamente de espécies vegetais; outros 24% foram de produtos derivados e 9% foram desenvolvidos através de modelagem molecular, onde as estruturas moleculares dos compostos serviram como precursores de processos de síntese química (ALVES, 2001).

Atualmente cerca de 50% dos medicamentos utilizados é de origem sintética e cerca de 30% de origem vegetal, isolados ou produzidos por semi-síntese, sendo que durante os últimos 20 anos, os fármacos de origem natural que apareceram no mercado são quase que na totalidade, oriundos das pesquisas científicas de países como China, Coréia e Japão, sendo a contribuição dos outros países bem menor (FOGLIO, 2006).

No Brasil, o uso das plantas medicinais teve grande influência da colonização portuguesa nos séculos XVI e XVII, que deixou profundas marcas nas práticas médicas populares do Brasil de hoje. A medicina era exercida pelos físicos, cirurgiões e barbeiros, além de padres da *Companhia de Jesus*, que tinham noções de primeiros socorros e botânica. Esses profissionais praticavam uma medicina impregnada de espírito de religiosidade marcada pela crença nas curas milagrosas através da intercessão de santos católicos junto aos poderes de Deus, tal como era em Portugal (CAMARGO, 1998).

As terapias daquele período histórico do Brasil eram praticamente as mesmas adotadas em Portugal, onde as plantas desempenhavam importante papel na preparação dos remédios (FRANÇA, 1926). Com as dificuldades em trazer plantas de Portugal, estas passaram a serem substituídas por plantas indígenas, uma vez que através do contato com os nativos, muito foi

sendo aprendido e assim, diversas plantas nativas foram incorporadas à coleção mantida nas boticas. (CAMARGO, 1997).

Com a chegada ao Brasil dos primeiros africanos de origem banto, oriundos de regiões localizadas abaixo do Equador, começaram os contatos destes com os indígenas, que foram passando seus conhecimentos sobre as plantas nativas e os papéis que as mesmas desempenhavam em seus rituais religiosos e de cura. A partir daí os africanos passaram a usá-las, também, em suas reuniões religiosas (CAMARGO, 1998).

Nas últimas décadas observou-se o ressurgimento do interesse acerca das diversas aplicabilidades das plantas medicinais, evidenciado pelo grande número de publicações voltadas para a fitoterapia. Alguns fatores têm contribuído para este aumento de interesse e entre eles está a grande eficácia de algumas substâncias antitumorais obtidas de plantas, como os alcaloides extraídos da espécie vegetal *Catharanthus roseus* G. Don (Apocynaceae), originário do Madagascar, descobertos no final dos anos 60, ainda considerados indispensáveis para o tratamento de leucemia, assim como os taxóides extraídos das espécies *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) (teixo do Pacífico) e *T. baccata* L. para cânceres ginecológicos (HOSTETTMANN, 2003; CRAGG et al., 1993). Outro fator que incentiva o estudo com plantas é a complexidade na descoberta de novas drogas; atualmente são necessários de sete a dez anos para o desenvolvimento completo. O volume de recursos envolvidos nesses estudos explica a concentração da pesquisa e desenvolvimento destes novos fármacos nos países ditos do primeiro mundo, detentores de tecnologia e recursos (MONTARI, 1995).

O Brasil é um país rico em diversidade e endemismo, com um território que inclui cinco biomas principais: a Floresta Amazônica, o Cerrado, a Mata Atlântica, o Pantanal e a Caatinga (GIORGETTI; NEGRI e RODRIGUES, 2007). Essa riqueza biológica torna-se ainda mais importante porque está aliada a uma sociodiversidade que envolve várias comunidades tradicionais e grupos étnicos, tais como etnias indígenas, comunidades quilombolas e outras populações tradicionais, com visões, saberes e práticas culturais próprias. Na questão do uso terapêutico das plantas, esses saberes e práticas estão intrinsecamente relacionados aos territórios e seus recursos naturais, como parte integrante da reprodução sociocultural e econômica desses povos e comunidades (BRASIL, 2006).

Neste sentido, compreende-se que o Brasil tem em mãos a oportunidade para estabelecer um modelo de desenvolvimento próprio e autônomo na área de saúde e uso de plantas medicinais e fitoterápicos, que prime pelo uso sustentável dos componentes da biodiversidade e respeite os princípios éticos e compromissos internacionais assumidos,

notadamente a convenção sobre diversidade biológica (CDB), e assim, promover a geração de riquezas com inclusão social. Esse contexto impõe a necessidade de uma ação transversal voltada ao fortalecimento da base produtiva e de inovação local e à competitividade da indústria nacional.

2.2 A FAMÍLIA VERBENACEAE NA MEDICINA TRADICIONAL

O gênero *Lippia* (Verbenaceae) inclui cerca de 200 espécies de ervas, arbustos e árvores de pequeno porte. As espécies estão distribuídas em países da América do Sul e Central, e os territórios da África tropical (TERBLANCHE e KORNELIUS, 1996).

O uso mais comum de espécies de *Lippia* é para o tratamento de doenças respiratórias, na América Central e do Sul (Guatemala, Venezuela, Brasil) também é empregado como um remédio para resfriado, gripe, bronquite, tosse e asma (PASCUAL et al., 2001). *L. organóides* H.B.K. (MORTON, 1981; DE VINCENZI et al., 1995), é utilizada como tempero para preparações alimentares. Na Venezuela, a decocção de *L. organóides* HBK é tomado para estimular o apetite (MORTON, 1981).

Além disso, a decocção e infusão destas plantas é tomado como remédio gastrointestinal em toda América do Sul e Central, África Tropical e alguns países europeus. Algumas delas são consideradas muito úteis no tratamento de dor de estômago e indigestão, como *L. alba* (Mill.) NE Brown, *L. citriodora* H.B.K. ou *L. triphylla* (L He'r.) Kuntze, *L. dulcis* Trevir., *L. micromera* Schau, *L. organóides* HBK, *L. reptans* HBK, *L. stoechadifolia* HBK e *L. concha* Griseb. (PARIS e MOYSE, 1971; BANDONI et al., 1972; MORTON, 1981; GIRÓN e CÁCERES, 1994; NAKAMURA et al., 1997; BALLERO; POLI e SANTUS, 1998).

No Brasil e na Guatemala, várias espécies *Lippia* são aplicados externamente para tratar doenças cutâneas, queimaduras, feridas, febre e no tratamento da gonorreia e da sífilis. (MORTON, 1981; GIRÓN et al., 1991; LEMOS et al., 1992; ZAMORA MARTÍNEZ-NIETO e DE PASCUAL, 1992, GIRÓN e CÁCERES, 1994; FORESTIERI et al., 1996).

A composição química dos óleos essenciais de muitas das espécies de *Lippia* foi investigada por meio de técnicas cromatográficas, sendo carvacrol, limoneno, β -cariofileno, p-cimeno, cânfora, linalol, α -pineno e timol os componentes encontrados com mais alta frequência (PASCUAL et al., 2001). Compostos fenólicos adicionais encontrados em espécies de *Lippia* são derivados de ácido p-cumárico e ácido ferúlico (SLOWING BARILLAS,

1992). A maioria dos flavonóides identificados são flavonas, frequentemente 6-hidroxilados flavonas e metoxiflavonas, mas alguns sulfatos flavonóides têm sido relatados em algumas espécies de *Lippia* (mono e disulfatos) (TOMÁS-BARBERÁN; HARBORNE e SELF, 1987).

A triagem *in vitro* tem demonstrado uma atividade inibitória reprodutível contra muitas das bactérias Gram-positivas mais frequentemente responsáveis por infecções respiratórias em seres humanos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*). (CÁCERES et al., 1991). Os óleos essenciais *L. sidoides* mostra uma atividade inibitória contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis*, uma baixa atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* (LEMOS et al., 1990), e contra alguns micro-organismos que vivem na pele dos pés e axilas (LACOSTE et al., 1996).

A *Lippia origanoides* Kunth, popularmente chamada de alecrim-de-tabuleiro, é nativa do semiárido nordestino e apresenta elevado potencial para produção de óleo essencial com propriedades antissépticas. Segundo Govaerts e Atkins (2012), tem como sinônimos *Lippia berteroi* Spreng. (1825), *Lippia microphylla* Benth. (1840), *Lippia schomburgkiana* Schauer (1847) e *Lippia origanoides* var. *sampaionis* Herter (1916). O óleo essencial *Lippia origanoides* Kunth possui ação antimicrobiana contra bactérias e leveduras causadoras de diversas doenças nos seres humanos (OLIVEIRA et al., 2007), antiprotozoários e citotóxica contra células cancerígenas (ESCOBAR et al., 2010). Além do óleo essencial, foram isolados e identificados no extrato da raiz dessa espécie dois compostos com ação citotóxica contra células cancerígenas (SANTOS et al., 2003).

Além de outros compostos com ação citotóxica contra células neoplásicas (SANTOS et al., 2003), antioxidantes e inibidoras da acetilcolinesterase (MORAIS et al., 2008), este arbusto aromático é produtor de óleo essencial, composto principalmente por carvacrol, timol, ρ -cimeno e γ -terpineno (OLIVEIRA et al., 2007), compreendendo de 1,0% (OLIVEIRA et al., 2007) a 4,6% (CAVALCANTE et al., 2009) da matéria seca das folhas, com ação contra bactérias, fungos (OLIVEIRA et al., 2007) e protozoários patogênicos e células neoplásicas humanas (ESCOBAR et al., 2010).

2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os vegetais respondem a estímulos ambientais bastante variáveis, de natureza física, química ou biológica. Fatores tais como fertilidade e tipo do solo, umidade, radiação solar,

vento, temperatura e poluição atmosférica, dentre outros, podem influenciar e alterar a composição química dos vegetais. Além do metabolismo primário, responsável pela produção de celulose, lignina, proteínas, lipídios, açúcares e outras substâncias que realizam suas principais funções vitais, as plantas também apresentam o chamado metabolismo secundário, do qual resultam substâncias de baixo peso molecular, às vezes produzidas em pequenas quantidades (ALVES, 2001). O metabolismo secundário não é essencial para o crescimento e desenvolvimento do indivíduo, mas essencial para a sobrevivência e continuidade da espécie dentro do ecossistema. Considera-se que uma das principais funções do metabolismo secundário nas plantas seja a biossíntese de estruturas complexas como alcaloides, terpenóides e derivados de fenilpropanóides (ALVES, 2001). Segundo Montanari (2002) a função fisiológica desses princípios ativos nas plantas associa-se à defesa da mesma contra doenças, pragas, radiação solar, entre outros.

A presença de vários princípios ativos nos extratos vegetais é explicada pelo fato das plantas normalmente desenvolverem uma série de metabólitos com funções complementares na defesa contra pragas e doenças. Essa estratégia impede o desenvolvimento de resistência por parte dos organismos prejudiciais. Muitos desses compostos, apesar de serem suficientes para matar insetos ou mesmo vertebrados de grande porte, quando utilizados em doses adequadas convertem-se em medicamentos. Desse modo, produtos secundários envolvidos na defesa através de atividade citotóxica contra patógenos podem ser úteis como agentes antimicrobianos na medicina. Além disso, aqueles envolvidos na defesa contra herbivoria através de atividade neurotóxica podem ter efeitos benéficos no homem atuando como antidepressivos, sedativos, relaxantes musculares ou anestésicos (BRISKIN, 2000).

Os óleos essenciais e os extratos de diversas espécies da planta podem controlar o crescimento dos micro-organismos relacionados à pele, à cárie dental, incluindo as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (SARTORATTO et al., 2004). Em 2000, Rauha e outros demonstraram a atividade antimicrobiana de extratos de 29 espécies de diversas famílias, comercializadas ou coletadas em diferentes locais da Finlândia, ricos em flavonoides, frente a nove micro-organismos, sendo esses efetivos contra Gram-positivos, como *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis*; e Gram-negativos como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*; e também fungos filamentosos, como *Aspergillus niger*, e leveduras como *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Do ponto de vista econômico, podem-se mencionar os alcalóides indólicos terpenoídicos vincristina (utilizado no tratamento de leucemia) e vimblastina (usado na terapia de corio-carcinomas e na doença de Hodgkin) de *Catharanthus roseus*, os quais tiveram seus

valores de mercado estimados em US\$ 6.000 e 12.000/g, respectivamente (HEGNAUER, 1997). Todavia, além do alto valor agregado que algumas drogas de origem vegetal apresentam, esta área demonstra um grande potencial no que concerne ao desenvolvimento de novos medicamentos, uma vez que a diversidade química associada à diversidade biológica encontrada em ecossistemas terrestres e aquáticos é um importante aspecto a ser considerado em processos e diretrizes de desenvolvimento de novos biofármacos. Como estimativa, cerca de 110.000 compostos têm sido identificados até o presente, sendo que deste total, os terpenóides constituem o maior grupo (~33.000 compostos), seguidos pelos alcalóides (~16.000 compostos) (HEGNAUER, 1997).

Os metabólitos secundários produzidos pelos vegetais são formados por vários caminhos biossintéticos que produzem moléculas dotadas de grande diversidade de esqueletos e grupamentos funcionais, como, entre outros, ácidos graxos (gorduras) e seus ésteres, hidrocarbonetos, alcoóis, aldeídos e cetonas, compostos acetilênicos, alcaloides, compostos fenólicos e cumarinas (ALVES, 2001).

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides. Os fenólicos são um grupo de compostos bastante presentes no nosso dia a dia, embora nem sempre nos demos conta disso. Desse modo, muito do sabor, odor e coloração de diversos vegetais que apreciamos são gerados por compostos fenólicos. Alguns desses compostos, como o aldeído cinâmico da canela (*Cinnamomum zeyllanicum*) e a vanilina da baunilha (*Vanilla planifolia*), são inclusive empregados na indústria de alimentos. Além disso, esse grupo de compostos é importante na proteção das plantas contra os raios UV, insetos, fungos, vírus e bactérias. Há inclusive, certas espécies vegetais que desenvolveram compostos fenólicos para inibir o crescimento de outras plantas competidoras (ação alelopática) (PERES, 2008).

Pode-se dizer que as plantas possuem dois tipos básicos de polímeros: os ácidos nucleicos (DNA e RNA) e as proteínas. Contudo existe uma terceira classe de compostos que se assemelham aos polímeros. Trata-se dos terpenos. Os monoterpênicos, devido ao seu baixo peso molecular, costumam ser substâncias voláteis, sendo, portanto denominados óleos essenciais ou essências. A função dos óleos essenciais nas plantas pode ser tanto para atração de polinizadores (principalmente os noturnos) quanto para repelência de insetos (PERES, 2008). Muitos sesquiterpenóides também são voláteis e, assim como os monoterpênicos, estão envolvidos na defesa contra pragas e doenças. Dois exemplos são o gossypol (dímero de C₁₅), o qual está associado à resistência a pragas em algumas variedades de algodão, e as

lactonas, presentes na família *Compositae* e responsáveis pelo gosto amargo de suas folhas (PERES, 2008).

Os alcalóides são uma classe de compostos do metabolismo secundário famosa pela presença de substâncias que possuem acentuado efeito no sistema nervoso, sendo muitas delas largamente utilizadas como venenos ou alucinógenos. Já na antiguidade há referência ao uso dessa classe de compostos. O caso mais famoso de seu uso trata-se da execução do filósofo grego Sócrates, condenado a ingerir cicuta (*Conium maculatum*), uma fonte do alcalóide coniina. Os romanos também faziam uso de alcalóides em homicídios, sendo os principais a hiosciamina, a atropina e a beladonna, todos derivados de *Atropa belladonna* (PERES, 2008). Além dos gregos e romanos, muitas outras culturas antigas usavam e ainda usam alcalóides como venenos, principalmente para o envenenamento de setas empregadas em caçadas e guerras. Exemplos disso são o extrato seco do curare (*Chondodendron tomentosum*), contendo o alcalóide tubocurarina, utilizado pelos índios da Bacia Amazônica, e a famosa estricnina extraída de *Strychnos nux-vomica* por nativos asiáticos. As sociedades modernas continuam fazendo largo uso dos alcalóides, inclusive em aplicações não lícitas como é o caso das drogas comercializadas no narcotráfico. Dois casos notáveis são o Dietilamida do Ácido Lisérgico (LSD) e a cocaína (PERES, 2008).

É possível proceder à análise dos constituintes ativos (metabólitos secundários) mediante testes de reações de caracterização química. Deste modo é confirmada a presença e quantificados os grupos de substâncias tais como alcalóides, flavonóides, taninos, antraquinonas e heterosídeos. São analisados os caracteres individuais de produção (inibição dos constituintes químicos) e reações químicas como Mayer na detecção de compostos como alcalóides ou de Liebermann-Bouchard na detecção de esteroides cardiotônicos, dentre outras. Pode-se também proceder à detecção dos constituintes ativos nas amostras em análise por Cromatografia de Camada Delgada (CCD), pela comparação dos vegetais-testes com padrões de identidade e constituição conhecidos (COSTA e PROENÇA DA CUNHA, 2000).

2.3.1 Timol e Carvacrol

Carvacrol e timol estão presentes como compostos principais em óleos essenciais de tomilho e orégano (AL-BANDAK e OREOPOULOU, 2007). Estes dois compostos são monoterpenos fenólicos e os isômeros de posição (Figura 1) que exercem um amplo espectro de atividade antimicrobiana contra bactérias tanto Gram-positivas e Gram-negativas.

Geralmente reconhecido como um aditivo de alimento seguro, o carvacrol é usado como um agente aromatizante em produtos assados, doces e bebidas (BURT, 2004). Também exibe ações antifúngica, inseticida, antiparasitária, anti-inflamatória, anti-leishmaniose, antioxidante, hepatoprotetora e antitumorais (ROBLEDO et al., 2005; VELDHUIZEN et al., 2006). Por outro lado, o timol tem recebido uma atenção considerável como um agente antimicrobiano que mostra atividade antifúngica muito elevada, sendo também um antioxidante excelente (YOUDIM e DEANS, 2000, SANCHEZ-GARCIA et al., 2008). A atividade antimicrobiana de ambos os compostos já foi estudada e relatada contra várias estirpes de bactérias, incluindo agentes patogênicos de origem alimentar como *B. cereus*, *E. coli*, e *Listeria monocytogenes* (HALLIWELL et al., 1995).

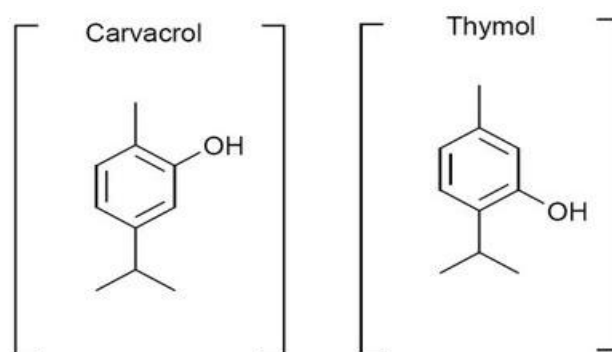


Figura 1 Estrutura molecular do timol e do carvacrol.

Guarda e colaboradores (2001) testaram a atividade antimicrobiana do timol e carvacrol através da determinação do MIC, e perceberam que ambos exibiram atividade contra todos os micro-organismos testados (*Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger*) e que embora sejam isômeros os valores de MIC encontrados foram diferentes, sendo o carvacrol mais eficiente. Além disso, houve um efeito sinérgico entre o carvacrol e timol para a inibição do crescimento de todos os micro-organismos em todas as combinações de concentrações testadas (50% Timol – 50% Carvacrol; 25% Timol – 75% Carvacrol; e 75% Timol – 25% Carvacrol).

Estudos revelaram que o carvacrol suprime a proliferação e promove o início da apoptose das células melanomas B16 de rato *in vitro* (HE et al., 1997) e inibe a síntese do DNA em mioblastos de rato contendo um oncogene N-ras humano, sugerindo que este composto pode atuar como um agente anticancerígeno (ZEYTINOGLU; INCESU e BASER, 2003). Além disso, mais tarde foi descrito que o carvacrol possui atividade antiplaquetária *ex*

vivo através da inibição da produção do tromboxano A₂ (TXA₂) e expressão do receptor GP IIb/IIIa. Essa propriedade parece estar relacionada à sua atividade antioxidante, haja vista a capacidade de inibição da cicloxigenase plaquetária pelos agentes antioxidantes (KARKABOUNAS et al., 2006).

Com base nas componentes principais encontrados nos óleos essenciais de *L. origanóides*, diferentes quimiotipos foram relatados no Brasil, Venezuela e Colômbia. Embora tenha sido mostrado que os métodos de extração e os fatores ambientais podem afetar a produção de metabólitos secundários em espécies de *Lippia*; pelo menos três diferentes quimiotipos podem ser diferenciados para *L. origanóides*, dois quimiotipos cujos compostos principais são carvacrol e timol, respectivamente, e um quimiotipo raro caracterizado pela ausência ou teor muito baixo destes compostos (VICUÑA, STASHENKO e FUENTES, 2010).

3 METODOLOGIA

Os testes antimicrobianos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais utilizados neste estudo foram cedidos pela Me. Gabriela Carinhanha Silva, discente do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (PPGRGV) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Bahia, Brasil, cujo trabalho objetivou a avaliação do efeito de substâncias reguladoras do metabolismo vegetal sobre o crescimento de plantas de *Lippia origanoides* Kunth, além da sua influência na produção de óleo essencial e na sua composição química. Para tanto, plantas propagadas vegetativamente cultivadas em casa de vegetação, receberam três pulverizações, sendo que na primeira delas, as plântulas tinham 137 dias de cultivo (Figura 2). As pulverizações tiveram um intervalo de 14 dias entre elas, com os seguintes tratamentos: ácido acetilsalicílico (AAS) a $90,08 \text{ mg.L}^{-1}$; ácido jasmônico (AJ) a $0,105 \text{ mg.L}^{-1}$; 6-benzilaminopurina (BAP) a 100 mg.L^{-1} ; ácido giberélico (GA_3) a 100 mg.L^{-1} ; água destilada (H_2O); bioestimulante comercial Stimulate® (STM, composto por $0,09 \text{ g L}^{-1}$ de cinetina, $0,05 \text{ g L}^{-1}$ de ácido indolbutírico e $0,05 \text{ g L}^{-1}$ de GA_3) a 2% (SILVA, 2012) (Figura 2). Ao final de cada tempo de coleta, houve a separação dos órgãos para secagem e pesagem, para posterior extração dos óleos (Figura 2-L).

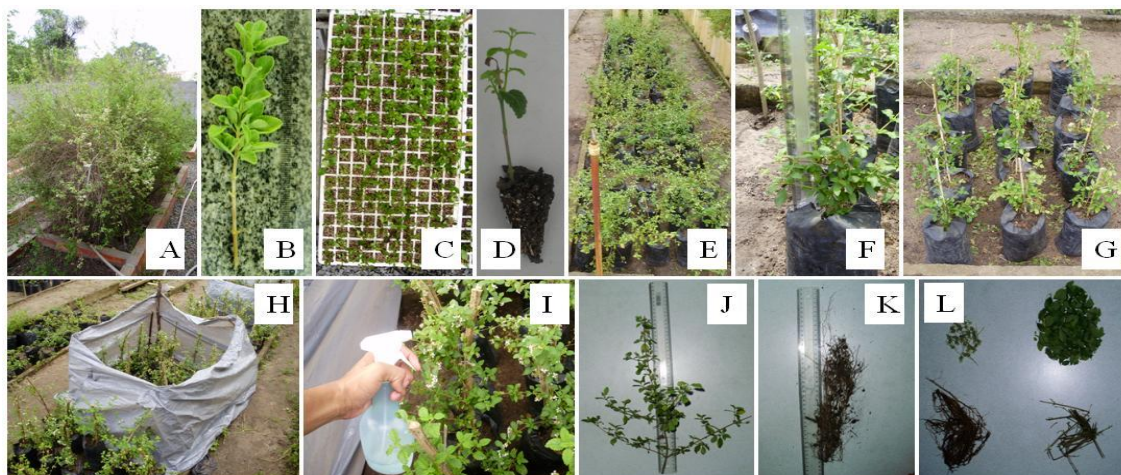


Figura 2 A - Plantas de *Lippia origanoides* da coleção de plantas aromáticas da Unidade Experimental Horto Florestal - UEFS; B - Estaca de *L. origanoides*. C – Estacas de *L. origanóides* cultivadas em bandejas de poliestireno; D - Mudas de *L. origanoides*; E – Plantas transplantadas para sacos de muda; F - Medição das plantas para a “poda de padronização”; G - Grupo de plantas constituinte de uma parcela (estimulador); H - Isolamento das parcelas para aplicação dos estimuladores; I - Aplicação dos estimuladores através de pulverizador manual; J - Medição da altura da planta; K - Medição da maior raiz da planta; L – Separação dos órgãos para secagem e pesagem (SILVA, 2012).

No trabalho de Silva (2012) foram realizadas três coletas, todas elas sete dias depois de cada aplicação, sendo que para a realização dos testes antimicrobianos foram utilizados os óleos essenciais resultantes das plantas da primeira e terceira coletas, devido à maior diferença na composição química dos mesmos (SILVA, 2012), totalizando 12 amostras testadas [AAS; AJ; H₂O (controle); GA₃; STM e BAP da primeira coleta e AAS; AJ; H₂O (controle); GA₃; STM e BAP da terceira coleta] (Tabela 1) no presente trabalho. O experimento de Silva (2012) foi conduzido na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Bahia, Brasil, entre os meses de outubro e dezembro de 2010. Os resultados da concentração dos seis principais componentes majoritários do óleo essencial de folhas e inflorescências de plantas cultivadas de *Lippia origanoides* Kunth submetidas a três pulverizações foliares são mostrados no Anexo deste trabalho.

3.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Diferentes concentrações das 12 amostras de óleos essenciais (1^a e 3^a coletas) (Tabela 1) foram individualmente testadas contra micro-organismos através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Microbicida Mínima (CMM), descritas a seguir.

Tabela 1. Concentração dos óleos testados extraídos das plantas da primeira e terceira coletas de folhas e inflorescências de *Lippia origanoides* após tratamento com hormônios reguladores do metabolismo vegetal e água de acordo com o micro-organismo testado.

Micro-organismos testados	Óleo - Concentração testada no MIC ($\mu\text{L.mL}^{-1}$)			
	1ª coleta		3ª Coleta	
<i>S. aureus</i> CCMB 262	AAS	20	AAS	20
	AJ	20	AJ	20
	BAP	20	BAP	20
	GA ₃	20	GA ₃	20
	H ₂ O	20	H ₂ O	20
	STM	20	STM	20
<i>S. aureus</i> CCMB 263	AAS	20	AAS	20
	AJ	20	AJ	20
	BAP	20	BAP	20
	GA ₃	20	GA ₃	20
	H ₂ O	20	H ₂ O	20
	STM	30	STM	20
<i>E. coli</i> CCMB 261	AAS	40	AAS	20
	AJ	30	AJ	40
	BAP	40	BAP	30
	GA ₃	40	GA ₃	30
	H ₂ O	30	H ₂ O	40
	STM	30	STM	40
<i>E. coli</i> CCMB 284	AAS	40	AAS	20
	AJ	30	AJ	40
	BAP	40	BAP	30
	GA ₃	40	GA ₃	30
	H ₂ O	30	H ₂ O	40
	STM	40	STM	40
<i>B. cereus</i> CCMB 282	AAS	40	AAS	20
	AJ	30	AJ	40
	BAP	40	BAP	40
	GA ₃	40	GA ₃	30
	H ₂ O	30	H ₂ O	40
	STM	40	STM	40
<i>C. albicans</i> CCMB 266	AAS	15	AAS	20
	AJ	20	AJ	20
	BAP	20	BAP	20
	GA ₃	20	GA ₃	20
	H ₂ O	20	H ₂ O	20
	STM	15	STM	20
<i>C. albicans</i> CCMB 286	AAS	20	AAS	20
	AJ	20	AJ	20
	BAP	20	BAP	20
	GA ₃	20	GA ₃	20
	H ₂ O	20	H ₂ O	20
	STM	20	STM	20

AAS – Ácido Acetilsalicílico; AJ – Ácido Jasmônico; H₂O – Água Destilada (Testemunha); GA₃ – Ácido Giberélico; STM – Stimulate® e BAP – 6-Benzilaminopurina.

3.2.1 Micro-organismos Teste

Os micro-organismos utilizados neste estudo foram: *Escherichia coli* (CCMB 261), sensível à trimetoprima e resistente à fluconazol, *Escherichia coli* (CCMB 284), resistente à sulfonamida, *Staphylococcus aureus* (CCMB 262) resistente à estreptomicina e dihidrostreptomicina, *Staphylococcus aureus* (CCMB 263), resistente à novobiocina, *Bacillus cereus* (CCMB 282), *Candida albicans* (CCMB 286) e *Candida albicans* (CCMB 266). As bactérias foram cultivadas em Ágar Müeller-Hinton (AMH) a 37°C por 24 h, e as leveduras foram cultivadas em AMH a 28°C por 48 h. Estes micro-organismos foram obtidos da Coleção de Culturas de Micro-organismos da Bahia (CCMB) da Universidade Estadual de Feira de Santana-BA.

3.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada utilizando-se a metodologia, com modificações, descrita na CLSI (2002; 2003), para as leveduras, e na CLSI (2003), bactérias, para os óleos essenciais da espécie estudada. Os testes foram realizados em Caldo Müeller-Hinton (CMH).

Em microplacas estéreis com 96 poços de poliestireno foram inicialmente distribuídos 90 µL do CMH duas vezes concentrado (CMH [2X]) nos poços de números 1A a 9A e dos poços 1B a 1H (demais poços), foram distribuídos 90 µL do CMH uma vez concentrado (CMH [1X]) (Figura 2).

Os óleos testados foram utilizados nas concentrações de 40, 30, 20 e 15 µL.mL⁻¹ de acordo com o descrito na Tabela 1.

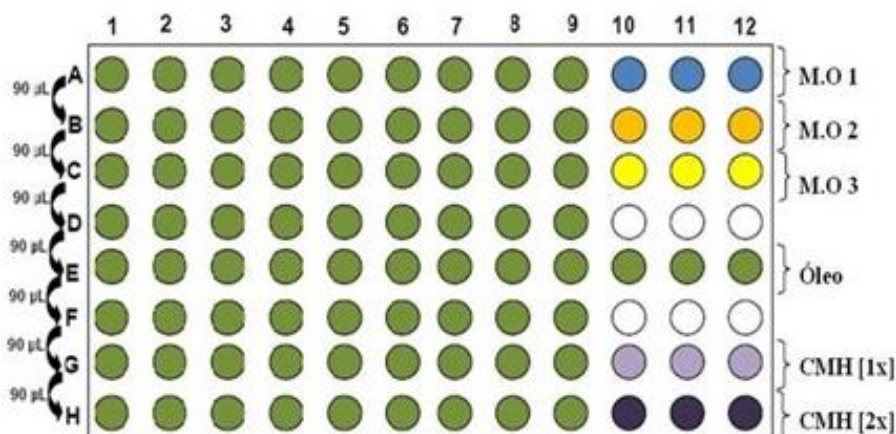


Figura 3 Esquema da placa de 96 poços para determinação da CIM. M.O 1; M.O 2 e M.O 3: Controle dos micro-organismos 1, 2 e 3. Óleo: Controle do óleo testado (50 µL de óleo + 90 µL CMH [1x]). CMH [1x] e [2x]: Controle do meio de cultivo (Caldo Müeller-Hinton) concentrado 1x e 2x, respectivamente.

A cada poço de 1A a 9A, além dos 90 µL do CMH [2X], foram adicionados 90 µL do óleo (Figura 3). Em seguida, foram feitas diluições seriadas retirando-se 90 µL dessa mistura (meio líquido de cultivo e óleo), transferindo-a para os poços seguintes que continham 90 µL do CMH [1X]. Ao chegar aos últimos poços (linha H) foram descartados 90 µL da mistura caldo/óleo para que todos os poços tivessem o mesmo volume de 90 µL. Depois de realizadas as diluições em todos os poços, foram adicionados 10 µL da suspensão do micro-organismo teste na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ para bactérias e $1,5 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ para leveduras, tendo cada poço agora um volume final de 100 µL. Foram feitos os controles da esterilidade do meio de cultura, viabilidade microbiana e esterilidade dos extratos.

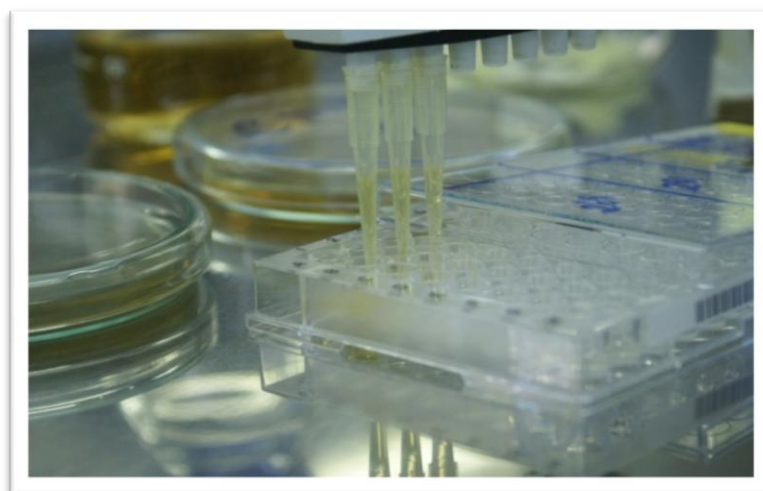


Figura 4 Esquema da execução da diluição seriada para a determinação da Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais das folhas e inflorescências de *Lippia origanoides* Kunth. Foto: A autora (2013).

Após o período de incubação foi adicionados 30 µL do revelador Resazurina 0,01%, preparado de acordo com o fabricante. As placas foram colocadas de volta à temperatura de incubação, por um período de 3 horas após o qual fez-se, então, a leitura da CIM.

Para avaliação da Concentração Microbicida Mínima (CMM), as concentrações que inibiram o crescimento dos micro-organismos foram semeadas em ágar Müeller Hinton e incubadas em estufas por 24 h a 37 °C para bactérias, e por 48 h a 28°C para leveduras, para posterior observação do crescimento dos inóculos. Foi considerada como CMM a menor concentração do óleo testado capaz de exercer efeito microbicida (bactericida ou fungicida), ou seja impedir o crescimento microbiano na placa contendo meio AMH.

3.2.3 Avaliação da Atividade Citotóxica

O bioensaio com *Artemia salina* foi baseado na técnica descrita por Meyer et al. (1982) com algumas modificações. Foram utilizados 10 mg de cistos viáveis de *A. salina* em 1000 mL de água preparada com 30 g de sal marinho sintético. Os ovos de *A. salina* foram incubados a temperatura ambiente por 48 h em sistema de aquário (25 x 24 x 12 cm) para que houvesse a eclosão das larvas. Com o auxílio de uma fonte de luz, as larvas foram atraídas e coletadas. Foram realizadas diluições seriadas dos óleos essenciais da espécie estudada, por adição de solução salina (NaCl a 0,45%) de modo a possibilitar a obtenção das concentrações finais de 40, 20 e 10 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de óleo, bem como concentrações referentes aos menores valores de MIC (0,62 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 0,31 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 0,15 $\mu\text{L.mL}^{-1}$). Com auxílio de uma pipeta graduada, foram transferidas 10 larvas para cada tubo de ensaio. Após 24 h em contato com a suspensão dos óleos, realizou-se a contagem do número de larvas sobreviventes através da observação em lupa estereoscópica (Figura 4). Todos os experimentos foram realizados em triplicata para as amostras contendo os óleos essenciais e amostras controle. O cálculo da concentração letal média (CL50) dos óleos foi feito a partir das três concentrações estudadas utilizando o teste dos Probitos usando o programa SPSS 9.0.



Figura 5: Observação das artemias em lupa estereoscópica. Foto: A autora (2013).

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados obtidos foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F, utilizando o software Statistica 7.0.0. Em seguida realizou-se o Teste de Comparação Múltipla de Tukey para avaliar a diferença entre as médias dos dados obtidos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM/MIC)

A Figura 6 mostra placa de 96 poços com resultados do teste antimicrobiano realizado frente a *E. coli* CCMB 261; *B. cereus* CCMB 282 e *E. coli* CCMB 284 utilizando o óleo resultante da primeira coleta de folhas e inflorescências de *Lippia organoides* Kunth após recebido o tratamento com água destilada, cujo valores de MIC são $1,87 \mu\text{L.mL}^{-1}$ (colunas 1-3); $0,93 \mu\text{L.mL}^{-1}$ (colunas 4-6) e $1,87 \mu\text{L.mL}^{-1}$ (colunas 7-9), respectivamente.

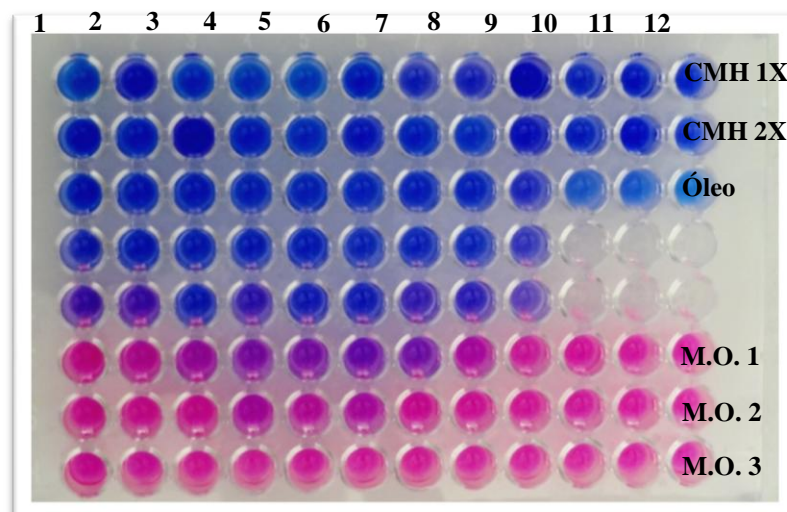


Figura 6 Placa de determinação da concentração inibitória mínima, representando a diluição em série do óleo essencial da folha de *Lippia organoides* Kunth. Tratamento recebido: H₂O - 1ª coleta. Colunas 1-3 contra *E. coli* CCMB 261, CIM $1,87 \mu\text{L.mL}^{-1}$; Colunas 4-6 contra *B. cereus* CCMB 282 CIM $0,93 \mu\text{L.mL}^{-1}$ e Colunas 7-9 contra *E. coli* CCMB 284 CIM $1,87 \mu\text{L.mL}^{-1}$; **CMH 1X e CMH 2X**: Controles do meio de cultura (CMH) [1x] e [2x], respectivamente; **Óleo**: Controle do óleo testado e **M.O. 1; M.O. 2 e M.O. 3**: controle do crescimento dos micro-organismos-teste *E. coli* CCMB 261, *B. cereus* CCMB 282 e *E. coli* CCMB 284, respectivamente.

A Tabela 2 apresenta os resultados da concentração inibitória mínima ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) dos óleos extraídos das plantas da primeira e terceira coletas após tratamentos com diferentes compostos reguladores do metabolismo vegetal (AAS, AJ, BAP, GA3 e STM) e água destilada (controle) frente às cepas bacterianas Gram-positivas: *S. aureus* CCMB 262, *S. aureus* CCMB 263, *B. cereus* CCMB 282; Gram-negativas: *E. coli* CCMB 261, *E. coli* CCMB 284, e às leveduras: *C. albicans* CCMB 266 e *C. albicans* CCMB 286.

Tabela 2 Concentrações Inibitórias Mínimas ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) dos óleos essenciais de *Lippia organoides* Kunth, resultantes das plantas da primeira e terceira coletas após tratamentos com diferentes compostos reguladores do metabolismo vegetal.

Espécie	Coleta	Tratamentos	S. a. 262*	S. a. 263*	E. c. 261*	E. c. 284*	B. c. 282*	C. a. 266*	C. a. 286*
<i>Lippia organoides</i> Kunth	1 ^a	AAS	1,25	0,31	0,62	0,62	0,62	0,93	1,25
		AJ	0,31	0,31	0,93	0,93	0,93	1,25	1,25
		BAP	0,62	1,25	0,62	0,62	0,62	5,0	1,25
		GA3	0,15	0,62	0,62	0,62	0,62	1,0	0,62
		H ₂ O	0,62	1,25	1,87	1,87	0,93	5,0	1,25
		STM	0,31	0,23	3,75	0,62	0,62	7,5	0,62
	3 ^a	AAS	0,31	0,15	1,25	0,62	0,62	2,5	1,25
		AJ	1,25	2,5	1,25	1,25	0,62	2,5	1,25
		BAP	2,5	2,5	1,87	0,93	0,62	5,0	1,25
		GA3	2,5	5,0	7,5	7,5	1,87	0,31	1,25
		H ₂ O	1,25	2,5	1,25	1,25	1,25	2,5	1,25
		STM	2,5	2,5	1,25	1,25	0,62	2,5	1,25

* número de identificação dos micro-organismos pela Coleção de Cultura de Micro-organismos da Bahia (CCMB); B. c.- *Bacillus cereus*, C. a. - *Candida albicans*, E. c. - *Escherichia coli* e S. a. - *Staphylococcus aureus*. Ácido Acetilsalicílico - AAS; Ácido Giberélico - GA3; Ácido Jasmônico - AJ; 6-Benzilaminopurina - BAP; Stimulate[®] - STM; Água Destilada (Testemunha) - H₂O.

Os resultados obtidos mostraram a presença da ação antimicrobiana dos óleos testados frente a todos os micro-organismos teste, porém em diferentes intensidades. Nota-se que os resultados pelo método MIC foram, em geral, melhores (menores valores de MIC) com os óleos da primeira coleta, exceto para *C. albicans* CCMB 266. As duas cepas de *S. aureus* testadas foram as mais sensíveis aos óleos da primeira coleta. Para os óleos da terceira coleta as cepas de *B. cereus* CCMB 282 e *C. albicans* CCMB 286 foram a mais sensível aos óleos testados (Tabela 2).

Considerando os óleos, na primeira coleta os óleos que, em geral, apresentaram melhores efeitos antimicrobianos, quando comparados com o controle (H₂O), foram GA3, AAS e AJ. Na terceira coleta o óleo resultante do tratamento com o AAS foi o que apresentou os menores valores de MIC, sendo assim considerado o mais efetivo. Portanto foi observado que o óleo resultante do tratamento com o AAS apresentou o melhor resultado antimicrobiano considerando as duas coletas. O óleo resultante do tratamento GA3 da terceira coleta foi a amostra que apresentou o maiores resultado de MIC, sendo seus valores, em geral, mais que duas vezes maiores que o controle (H₂O) (Tabela 2).

A Figura 7 ilustra os resultados obtidos através da análise de variância dos valores de MIC ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) em relação aos óleos essenciais de *Lippia organoides* obtidos após tratamento com agentes reguladores do metabolismo vegetal (AAS, AJ, BAP, GA3 e STM) e água, da primeira e terceira coletas.

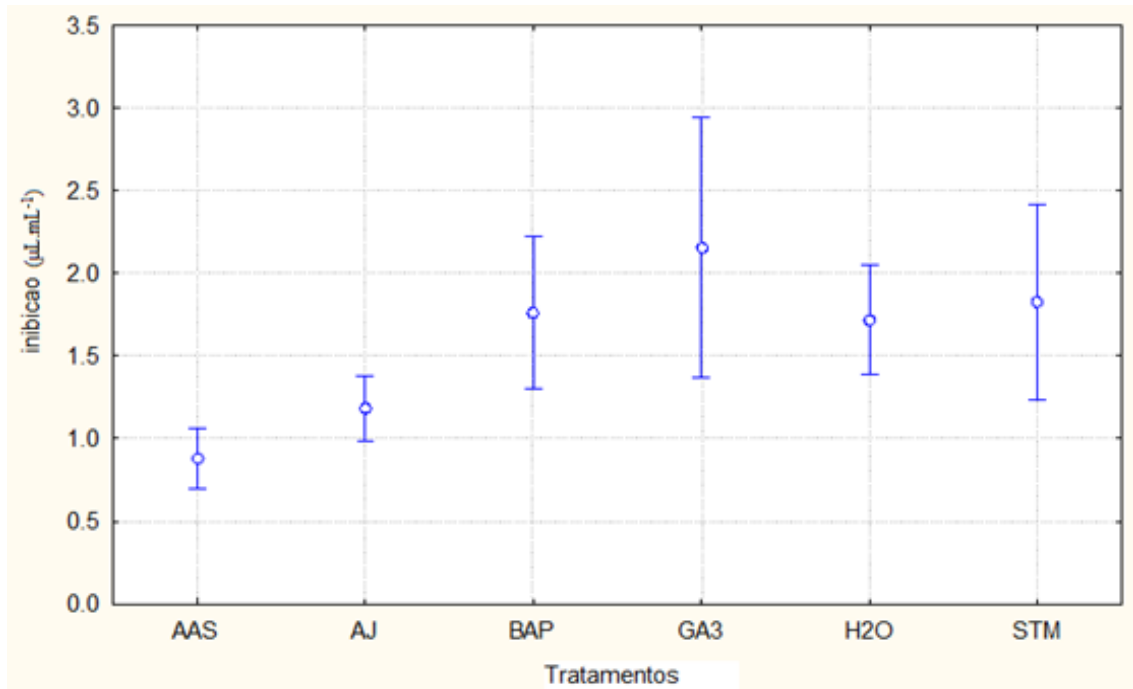


Figura 7 Análise de variância dos valores de MIC em relação aos óleos essenciais de *Lippia origanoides* obtidos após tratamento com agentes reguladores do metabolismo vegetal e água, da primeira e terceira coletas. As barras verticais indicam intervalo de confiança de 0,95. Ácido Acetilsalicílico – AAS; Ácido Giberélico – GA3; Ácido Jasmônico – AJ; 6-Benzilaminopurina – BAP; Stimulate[®] – STM; Água Destilada (Testemunha) – H₂O.

Na Figura 7 foi observado que, quando avaliadas as duas coletas conjuntamente, houve diferença estatística do óleo obtido após tratamento com o AAS em relação aos óleos obtidos após tratamento com o BAP, GA3, H₂O e STM, porém esta não houve esta diferença do AAS em relação ao óleo obtido após tratamento com o AJ. Assim, não se pode inferir qual tratamento foi o mais efetivo frente aos micro-organismos testados, quando analisadas as duas coletas conjuntamente.

A Figura 8 mostra os valores de MIC ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) em relação aos micro-organismos testados com os óleos essenciais de *Lippia origanoides* obtidos após tratamento com agentes reguladores do metabolismo vegetal (AAS, AJ, BAP, GA3 e STM) e água, para os dois períodos de coleta.

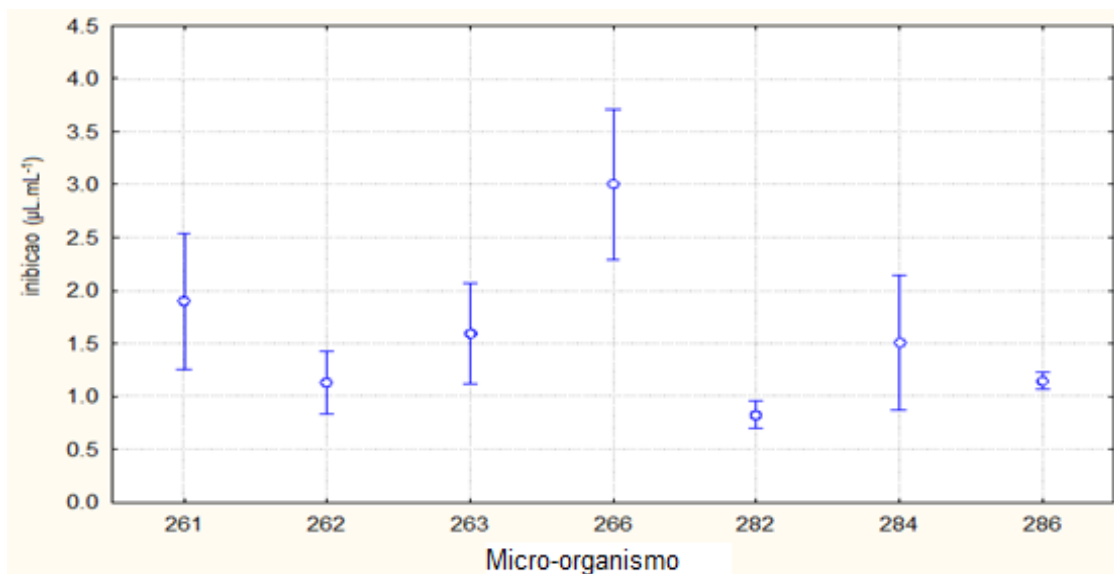


Figura 8 Análise de variância dos valores de MIC em relação aos micro-organismos testados com os óleos essenciais de *Lippia origanoides* obtidos após tratamento com agentes reguladores do metabolismo vegetal e água, da primeira e terceira coletas. As barras verticais indicam intervalo de confiança de 0,95. B. c.- *Bacillus cereus*, C. a. – *Candida albicans*, E. c. – *Escherichia coli* e S. a. – *Staphylococcus aureus*.

Na Figura 8 foi possível observar uma diferença significativa entre as cepas de *C. albicans* CCMB 266 e CCMB 286, sendo possível notar que a cepa de *C. albicans* CCMB 266 foi mais resistente aos óleos testados do que a cepa de *C. albicans* CCMB 286, tanto da primeira quanto da terceira coleta, indicando uma diferença no perfil de sensibilidade destas cepas (Tabela 2). Alguns autores (SANGLARD, 2003; PRASAD e SMRITI, 2002) afirmam que existem diversos mecanismos pelos quais as leveduras se tornam resistentes aos antifúngicos. A resistência pode resultar da (a) super expressão do gene ERG11, que codifica uma enzima envolvida na desmetilação de 14- α -lanosterol; (b) uma diminuição da afinidade do mutante Erg11p por azóis; (c) incapacidade de células em acumular antifúngicos devido à super expressão dos genes MDR1, CDR1 e CDR2 que codificam grandes bombas de efluxo de drogas que utilizam a força próton-motiva e ATP para o transporte de drogas através da membrana plasmática, e finalmente (d) uma alteração da via de biossíntese de ergosterol, decorrentes da inativação do esteroide C5,6-dessaturase codificada pelo gene ERG3. Considerando essa informação, pode-se supor que talvez esses mecanismos estejam envolvidos na discrepância de resposta encontrada nesse estudo para as cepas de *C. albicans*.

Por outro lado, não houve diferença estatística significativa entre os valores de MIC encontrados para as cepas de *E. coli* CCMB 261 e CCMB 284, bem como entre as cepas de *S. aureus* CCMB 262 e CCMB 263 (Figura 8). Indicando que houve semelhança no perfil de sensibilidade entre as cepas de cada micro-organismo para os óleos testados, ainda que tenha

prevalecido maior sensibilidade dos micro-organismos aos óleos resultantes da primeira coleta (Figura 8).

Foi também realizada a análise de variância dos valores de MIC em relação ao período de coleta das plantas após tratamento com agentes reguladores do metabolismo vegetal e água, da primeira e terceira coletas (Figura 9).

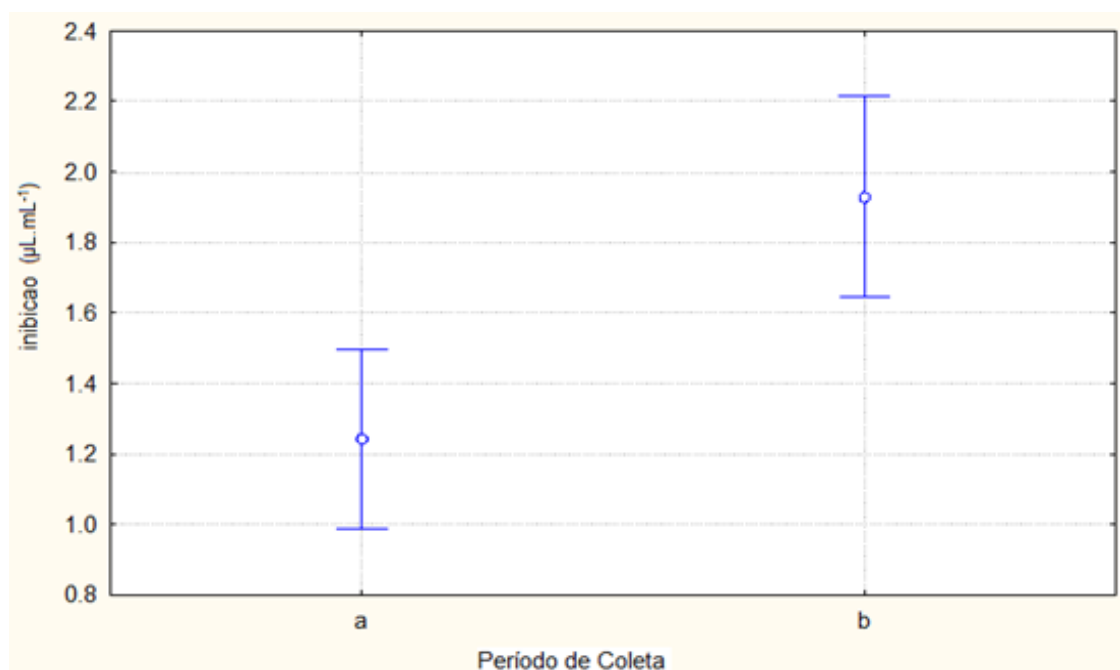


Figura 9 Análise de variância dos valores de MIC em relação ao período de coleta das plantas após tratamento com agentes reguladores do metabolismo vegetal e água, da primeira e terceira coletas. As barras verticais indicam intervalo de confiança de 0,95. a – primeira coleta; b – terceira coleta.

Na Figura 9 notou-se que a variação nos valores de MIC necessários para a inibição do crescimento microbiano está associada à época de coleta da planta (1^a ou 3^a coleta), provavelmente devido às variações na composição química do óleo essencial entre as duas coletas. Diversos autores (KOENEN, 2001; LOPES et al., 1997; DUSCHATZKY et al., 1999; MOUDACHIROU et al., 1999 e DE VASCONCELOS SILVA et al., 1999) afirmam que a época, e até mesmo o número de horas que as plantas recebem de luz solar, podem influenciar a fitoquímica e a produtividade do óleo essencial das mesmas, uma vez que alguns compostos podem ser acumulados em um determinado período para responder às mudanças ambientais. Entretanto, no trabalho de Silva (2012) foi observado que os compostos majoritários (ρ -cimeno, carvacrol, γ -terpineno, (E)-cariofileno, timol e biciclogermacreno) encontrados em todos os óleos das plantas submetidas aos tratamentos com agentes reguladores do metabolismo vegetal (AAS, AJ, BAP, GA3 e STM) e água não diferiam com relação à concentração dos mesmos em todos os tratamentos (Anexo).

Foram observadas diferenças também no tipo de inibição (bacteriostático ou bactericida) que os micro-organismos testados sofreram, sendo $0,62 \mu\text{L.mL}^{-1}$ o menor valor de Concentração Microbicida Mínima (CMM) obtido para alguns óleos contra as bactérias *E. coli* CCMB 261, *E. coli* CCMB 284 e *B. cereus* CCMB 282. Os resultados da CMM dos óleos resultantes da primeira coleta, mais uma vez, apresentaram melhores resultados (menores valores de CMM), reafirmando a maior eficiência dos mesmos também como microbicidas (Tabela 3), especialmente contra as bactérias anteriormente citadas.

Tabela 3 Concentrações Microbicidas Mínimas ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) dos óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth, resultantes das plantas da primeira e terceira coletas após tratamentos com diferentes compostos reguladores do metabolismo vegetal.

Espécie	Coleta	Tratamentos	S. a. 262*	S. a. 263*	E. c. 261*	E. c. 284*	B. c. 282*	C. a. 266*	C. a. 286*
<i>Lippia origanoides</i> Kunth	1ª	AAS	N	N	0,62	0,62	0,62	N	N
		AJ	2,5	N	3,75	3,75	N	N	N
		BAP	N	N	0,62	5,0	0,62	N	N
		GA3	5,0	N	1,25	1,25	0,62	N	N
		H ₂ O	N	N	1,87	1,87	0,93	N	N
		STM	N	3,75	3,75	1,25	0,62	N	N
	3ª	AAS	N	N	N	0,62	1,25	N	N
		AJ	N	N	1,25	2,5	0,62	N	N
		BAP	N	N	3,75	1,87	0,62	N	N
		GA3	N	N	N	7,5	3,75	N	N
		H ₂ O	N	N	2,5	1,25	1,25	N	N
		STM	N	N	1,25	1,25	0,62	N	N

* número de identificação dos micro-organismos pela Coleção de Cultura de Micro-organismos da Bahia (CCMB); N: amostra sem atividade microbicida; B. c.- *Bacillus cereus*, C. a. – *Candida albicans*, E. c. – *Escherichia coli* e S. a. – *Staphylococcus aureus*. Ácido Acetilsalicílico – AAS; Ácido Giberélico – GA3; Ácido Jasmônico – AJ; 6-Benzilaminopurina – BAP; Stimulate® – STM; Água Destilada (Testemunha) – H₂O.

Considerando os resultados de MMC (Tabela 3), foi observado que as cepas de *E. coli* CCMB 261 e 284 e a de *B. cereus* CCMB 282 foram as mais sensíveis aos óleos testados, já que houve ação bactericida sobre as mesmas da maioria dos óleos testados, com exceção dos óleos resultantes dos tratamentos AJ da primeira coleta, e AAS e GA3 da terceira coleta.

Segundo Betancur-Galvis et al. (2011) é difícil atribuir a atividade antimicrobiana de uma mistura complexa como um óleo essencial a algum componente particular e para determinar a contribuição de cada componente principal à atividade do óleo de *L. origanoides*, estes autores avaliaram a atividade antifúngica do timol, carvacrol, p-cimeno e gama-terpineno. Nesse estudo, apenas timol e carvacrol foram ativos contra os fungos avaliados (*Candida parapsilosis* ATCC 22019), *C. krusei* ATCC 6258, *Aspergillus flavus* ATCC 204304 e *A. fumigatus* ATCC 204305), no entanto, os valores de MIC foram superiores aos encontrados para os óleos. Nesse estudo, assim como no realizado por

Cosentino e outros (1999), não houve atividade para o p-cimeno e o gama-terpineno. Já Tampieri et al. (2005) relataram que monoterpenos como gama-terpineno, p-cimeno e carvacrol apresentaram boa atividade antifúngica, na concentração de 100 mg.mL^{-1} , contra *C. albicans*.

Costa (2005) estudou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. origanoides* através da metodologia de difusão em disco e observou atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* (13,5 mm de halo de inibição), valor próximo ao obtido com o antibiótico novobiocina (16 mm), e *Candida albicans* (9 mm), tendo melhor resultado que o antibiótico nistatina (8 mm). Estes metabolitos também se mostraram ativos contra cepas de *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus casei* e *Streptococcus mutans* (OLIVEIRA et al., 2007).

Rattanachaikunsopon e Phumkhachorn (2010) após testarem o carvacrol e o cimeno contra *V. cholerae* perceberam que embora o cimeno não iniba o crescimento das bactérias, ele pode melhorar a atividade antimicrobiana de carvacrol, e independentemente da estirpe bacteriana a atividade antimicrobiana de carvacrol aumentou com o aumento da concentração de cimeno. O mecanismo do efeito sinérgico do cimeno sobre a atividade antimicrobiana do carvacrol ainda é desconhecido, embora o mecanismo de ação de ambos os compostos tenha sido extensivamente estudado. O carvacrol pode causar a morte celular, uma vez que danifica a membrana citoplasmática levando ao colapso da bomba de prótons e esgotamento do pool de ATP. Por outro lado, o cimeno tendo uma alta preferência pelas membranas citoplasmáticas, pode causar a tumefação da membrana. Assim, é possível que o efeito sinérgico do cimeno sobre a atividade do carvacrol se dê porque o acúmulo do cimeno causando a expansão da membrana plasmática, aumente o transporte de carvacrol para dentro da célula (ULTEE, BENNIK e MOEZELAR, 2002).

Para confirmar a correlação entre a atividade do óleo com a percentagem dos seus componentes principais, Betancur-Galvis et al. (2011) avaliaram a composição percentual dos componentes principais do óleo pelo modelo de regressão de Cox. Timol e carvacrol foram os principais componentes, associados à atividade antifúngica do óleo para espécies de *Candida*.

Os trabalhos de Bakkali et al. (2008), Guarda et al. (2011) e Kurek (2013) mostraram que o timol e carvacrol, componentes majoritários dos óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth, foram altamente eficientes frente a micro-organismos enteropatógenos (*E. coli*, *Bacillus*, *S. aureus* e *Salmonella*).

No presente trabalho, em todos os óleos testados, os componentes majoritários apresentaram concentrações com valores muito próximas, tanto na primeira quanto na terceira coletas (Anexo). Estes resultados poderiam estar indicando que, provavelmente, os componentes majoritários aqui testados não sejam os únicos ou principais responsáveis pela ação antimicrobiana encontrada. É provável que eles atuem de forma sinérgica na presença dos outros componentes minoritários mais ativos dos óleos.

Geralmente, os componentes majoritários refletem muito bem as características biofísicas e biológicas dos óleos essenciais a partir dos quais eles foram isolados (IPEK et al., 2005), a amplitude do seu efeito sendo apenas dependente da sua concentração, quando foram testados isoladamente ou em óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008). No entanto, é possível que a atividade dos componentes principais seja modulada por outras moléculas pequenas (BAKKALI et al., 2008; HOET et al., 2006). Além disso, é provável que os vários componentes dos óleos essenciais desempenhem um papel na definição da fragrância, densidade, textura, cor e, acima de tudo, penetração celular, atração lipofílica ou hidrofílica e de fixação nas paredes celulares e membranas, e distribuição celular (CAL, 2006).

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

Com o objetivo de analisar a toxicidade de novos produtos naturais, pode-se utilizar o ensaio de letalidade com o microcrustáceo *Artemia salina*, desenvolvido inicialmente para a detecção de compostos bioativos em extratos vegetais (MEYER et al., 1982; NICK, RALI e STICHER, 1995; RUIZ et al., 2005; LHULLIER et al., 2006; SILVA et al., 2007), e que também pode ser utilizado para expressar a toxicidade de produtos naturais, como extratos de plantas e de produtos marinhos (SHOEB et al., 2007; MOTA et al., 2008).

A utilização de bioensaios para o monitoramento da bioatividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas vem crescendo consideravelmente nos laboratórios de pesquisa em nível mundial como método alternativo para o uso de animais de laboratório (NUNES et al., 2008). Adicionalmente, alguns trabalhos (MCLAUGHLIN et al., 1995; CARBALLO et al., 2002) mostram boa correlação entre o ensaio de letalidade com larvas de *A. salina* e a citotoxicidade em linhagens de células humanas, além das atividades antitumoral, inseticida (MEYER et al., 1982; MCLAUGHLIN et al., 1995) e anti-*Trypanosoma cruzi* (ALVES et al., 2000) para esses produtos.

De acordo com o bioensaio realizado, os óleos resultantes das plantas da primeira e terceira coletas após tratamentos com diferentes compostos reguladores do metabolismo vegetal (ácido giberélico (100 mg.L^{-1}); 6-benzilaminopurina (100 mg.L^{-1}); ácido jasmônico ($0,105 \text{ mg.L}^{-1}$); ácido acetilsalicílico ($90,08 \text{ mg.L}^{-1}$); Stimulate[®] (2%) e água destilada, apresentaram 100% de letalidade nas concentrações de $40 \text{ } \mu\text{L.mL}^{-1}$, $20 \text{ } \mu\text{L.mL}^{-1}$ e $10 \text{ } \mu\text{L.mL}^{-1}$, bem como nas concentrações referentes aos menores valores de MIC, $0,62 \text{ } \mu\text{L.mL}^{-1}$, $0,31 \text{ } \mu\text{L.mL}^{-1}$ e $0,15 \text{ } \mu\text{L.mL}^{-1}$.

Observaram-se os mesmos resultados para as amostras contendo somente o controle do agente dispersante Tween 80, o que permite inferir que o efeito encontrado se deve a ação do mesmo e não dos óleos essenciais testados no experimento, assim não sendo possível determinar e avaliar a existência de ação citotóxica destes.

CONCLUSÃO

Os resultados relativos ao potencial antimicrobiano de *Lippia origanóides* variaram de acordo com o tratamento recebido (ácido giberélico; 6-benzilaminopurina; ácido jasmônico; ácido acetilsalicílico; Stimulate[®] e água), período de coleta e o micro-organismo, demonstrando a variedade química presente nas amostras testadas, suas possíveis interações, além da suscetibilidade dos micro-organismos testados.

Quanto aos microrganismos testados, foi observada uma variação na sensibilidade/resistência dos mesmos, sendo que diferentes cepas de *C. albicans* apresentaram diferentes comportamento.

Os óleos resultantes da primeira coleta de plantas foram, em geral, mais eficientes que os da terceira. Na primeira coleta, os óleos resultantes dos tratamentos GA3, AAS e AJ que apresentaram maior efeito inibitório sobre os micro-organismos testados, quando comparados com o controle (tratamento das plantas com água). Na terceira coleta das plantas, o óleo resultante do tratamento com AAS foi o que se destacou, apresentando os melhores resultados de MIC. Assim, considerando-se ambas as coletas, o óleo resultante das plantas que receberam o tratamento com o AAS, foi o que apresentou melhor atividade inibitória frente aos microrganismos testados.

Portanto, o presente estudo demonstrou a presença de atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Lippia origanóides* testados, demonstrando seu potencial como base para novos fármacos e fundamentando o uso da mesma pela medicina tradicional. Além disso, evidencia a necessidade da realização de outros trabalhos para a complementação e aprofundamento dos estudos e aplicações, como isolamento dos possíveis agentes antimicrobianos e atividades citotóxicas.

REFERÊNCIAS

- AL-BANDAK, G., OREOPOULOU, V. Antioxidant properties and composition of Majorana syriaca extracts. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, p. 247–255, 2007.
- ALMEIDA, C.F.C.B.R., et al. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments**, n 62, p.127–142, 2005.
- ALVES, et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 367-373, 2000.
- ALVES, Hélio de Mattos. A diversidade química das plantas como fonte de fármacos. **Quim. Nova**, n 3, 2001.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.
- BALLERO, M.; POLI, F.; SANTUS, M. Plants used in folk medicine of Monteleone (Northern Sardinia). **Fitoterapia**, v. 69, p. 52–64, 1998.
- BANDONI, A.L., MENDIONDO, M.E., RONDINA, R.V.D., COUSSIO, J.D. Survey of Argentine medicinal plants. I. Folklore and phytochemical screening. **Journal of Natural Products**, v. 35, p. 69–81, 1972.
- BERLIN, E.A., BERLIN, B. Some field methods in medical ethnobiology. **Field Methods**, nº 17, p. 268, 2005.
- BETANCUR-GALVIS, L. et al. Antifungal, cytotoxic and chemical analyses of essential oils of *Lippia origanoides* H.B.K grown in Colombia. **Salud UIS**, v. 43, p. 141-148, 2011.
- BIESKI I. G. Plantas medicinais e aromáticas no sistema único de saúde da região sul de Cuiabá-MT. Monografia, Universidade Federal de Lavras, MG, p. 92, 2005.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada RDC 48 de 16 de março de 2004**. Diário Oficial da União de 18 de Março de 2004. Brasília. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>, Consulta em: 26 jan 2012.
- _____, Ministério da Integração Nacional, Secretaria de Políticas de Desenvolvimento Regional. **Nova Delimitação do Semiárido Brasileiro**. Brasília, 2005.
- _____, Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Série B - Textos Básicos de Saúde**, Brasília, 2006.
- BRISKIN, D. P. Medical plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant Physiology**, v. 124, 2000.

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

CÁCERES, A., ÁLVAREZ, A.V., OVANDO, A.E., SAMAYOA, B.E. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against Gram-positive bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 31, p.193–208, 1991.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal and Biological Research*, v.33, p. 179–189, 2000.

CAL, K. Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles. *Planta Med*, v. 72, p. 311–316, 2006.

CAMARGO, M.T.L. Contribuição ao estudo etnobotânico de plantas do gênero *Erythrina* usadas em rituais afro-brasileiros. *Rev. Instituto de Estudos Brasileiros*, nº 42, São Paulo, 1997.

CAMARGO, M.T.L As plantas na medicina popular e nos rituais afro-brasileiros. *Investigações Folclóricas*, v. 13, Buenos Aires, Argentina, 1998.

CARBALLO JL, et al. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol*, v. 2, p. 1–5. 2002.

CLSI. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras**; Norma Aprovada – 2. ed. Estados Unidos. 2002.

_____. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—6th Edition. United States of America. 2003b.

COSENTINO, S. et al. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 29, p. 130-135, 1999.

COSTA, A.F., PROENÇA DA CUNHA, A. **Farmacognosia – Farmacognosia experimental**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 3 ed., v.3. 2000.

COSTA, S.M.O. et al. Constituents of the Essential Oil of *Lippia microphylla* Cham. From Northeast Brazil. *The Journal of Essential Oil Research*, v. 17, p. 378-379, 2005.

CRAGG, G. M. et al. The taxol supply crisis: New NCI policies for handling the lager-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. *J. Nat. Prod*, v. 556, p.1657–1668. 1993.

DE VASCONCELOS SILVA, M.G. et al. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. *Fitoterapia*, v. 70, 1999.

DE VINCENZI, M., MAIALETTI, F., DESSI, M.R. Monographs on botanical flavouring substances used in foods. Part IV. *Fitoterapia*, v. 66, p. 203–210, 1995.

DUSCHATZKY, C.B. et al. Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants. *Antivir. Chem. Chemother*, v. 16, p. 247–251, 2005.

ESCOBAR, P. et al. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp. essential oils and their major components. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 2, p. 184–190, 2010.

FOGLIO, M. A. et al. Plantas Mediciniais Como fontes de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. *Multiciência* (UNICAMP), v. 7, 2006.

FORESTIERI, A.M. et al. Antiinflammatory, analgesic and antipyretic activity in rodents of plant extracts used in African medicine. *Phytotherapy Research*, v. 10, p. 100–106, 1996.

FRANÇA, C. Os portugueses no século XVI e a história natural do Brasil. *Rev. Hist*, v. 15, p. 35–166, 1926.

GIORGETTI, M.; NEGRI, G. e RODRIGUES, E. (2007). Brazilian plants with possible action on the central nervous system—A study of historical sources from the 16th to 19th century. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 109, p. 338–347.

GIRÓN, L.M., FREIRE, V., ALONZO, A., CÁCERES, A. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 34, p. 173–187, 1991.

GIRÓN, L.M., CÁCERES, A. *Técnicas Básicas para el Cultivo y Procesamiento de Plantas Medicinales*. CEMAT, Guatemala, p. 51–52, 1994.

GOFF J. *As doenças têm história*. 2a ed. Lisboa: Terramar; 1997.

GOVAERTS, R. e ATKINS, S. *World Checklist of Verbenaceae*. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em: <http://apps.kew.org/wcsp/synonymy.do?name_id=113656>. Acesso em: 07/03/2012.

GUARDA et al. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol International. *Journal of Food Microbiology*, v. 146, p. 144–150, 2011.

GURIB-FAKIM, A., Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, n 27, p. 1–93, 2006.

HALLIWELL, B. et al. The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, v. 33, p. 601–617, 1995.

HE, L. ET AL. Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas *in vitro* and *in vivo*. *J Nutr*, v. 127, p. 668–674, 1997.

HEGNAUER, R.; HEGNAUER M. *Chemotaxonomie der Pflanzen*. General register, Birkhäuser Verlag, Basel. 1997.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C., A importância das plantas medicinais: princípios ativos de plantas superiores. **Série de textos da Escola de Verão em Química - IV**, São Carlos, SP. Ed. UFSCar, p. 152, 2003.

HOET, S. et al. Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. **Planta Med**, v. 72, p. 480–482, 2006.

IPEK, E. et al. 2005. Genotoxicity and antigenotoxicity of origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. **Food Chem.** 93, 551–556, 2005.

JOHNSON, L.M. Gitksan medicinal plants – cultural choice and efficacy. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, n 2, p. 29, 2006.

JÚNIOR, W. S. F.; LADIO, A. H. E ALBUQUERQUE, U. P. DE. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. **Journal of Ethnopharmacology**, n 138, p. 238–252, 2011.

KARKABOUNAS, S. et al. Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol. **Exp Oncol**, v. 28, p. 121–125, 2006.

KOENEN, E.V. Medicinal poisonous and edible plants in Namibia. **Klaus Hess Publishers**, Verlag, Berlin, 2001.

KUREK, M. et al. Antimicrobial efficiency of carvacrol vapour related to mass partition coefficient when incorporated in chitosan based films aimed for active packaging. **Food Control**, v. 32, p. 168–175, 2013.

LACOSTE, E. et al. Antiseptic properties of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Application to the cutaneous microflora. **Annales Pharmaceutiques Francaises**, v. 54, p. 228–230, 1996.

LEMOS, T.L.G. et al. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. **Phytotherapy Research**, v. 4, p. 82–84, 1990.

LEMOS, T.L.G. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Brazilian plants. **Fitoterapia**, v. 63, p. 266–268, 1992.

LORENZI H, MATOS FJA. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum; 2002.

LOPES, P.N. et al. Circadian and seasonal variation in the essential oil from *Virola surinamensis* leaves. **Phytochemistry**, v. 46, p. 689–693, 1997.

LHULLIER, C.; HORTA, P.A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, p. 158–163, 2006.

MCLAUGHLIN, J.L.; SAIZARBITORI, T.C.; ANDERSON, J.E. Tres bioensayos simples para quimicos de productos naturales. **Rev. Soc. Venez. Quim.**, v. 18, p. 13–18, 1995.

MEYER, B.N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med**, v. 45, p. 31–34, 1982.

MONTANARI, J. I. **Aspectos da Produção Comercial de Plantas Medicinais Nativas**, CPQBA-UNICAMP, C.P. 6171, CEP: 13.081-970 Campinas–SP. E-mail: iliomj@cpqba.unicamp.br 16/08/2002.

MOTA, K.S.L. et al. Evaluation of the toxicity and antiulcerogenic activity of the ethanol extract of *Maytenus obtusifolia* Mart. Leaves. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 18, p. 441–446, 2008.

MORAIS, S.M. et al. Atividade Sequestradora de Radical Livre, Teor de Compostos Fenólicos e Inibição da Acetilcolinesterase de Extratos de Plantas Medicinais das Farmácias Vivas. In: 48º Congresso Brasileiro de Química, Rio de Janeiro - RJ (**Anais**), 2008. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2008/trabalhos/7/7-445-4813.htm>> Acesso em: 09/07/2012.

MORTON. **Atlas of Medicinal Plants of Middle America**, Springfield, Illinois, USA, v. 1. p. 745–750, 1981.

MOUDACHIROU, M. et al. Chemical composition of essential oil of eucalyptus from Benin: *Eucalyptus citriodora* and *E. camaldulensis*. Influence of location, harvest time, storage of plants and time of steam distillation. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, p. 109–118, 1999.

NAKAMURA, T. et al. Acteoside as the analgesic principle of Cedron (*Lippia triphylla*), a Peruvian medicinal plant. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 45, p. 499–504, 1997.

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

NICK, A.; RALI, T.; STICHER, O. Biological screening of traditional medicinal plants from Papua New Guinea. **J. Ethnopharmacol.**, v. 49, p. 147–156, 1995.

NUNES, X.P. et al. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, 718–723, 2008.

PARIS, R.R., MOYSE, H. **Matière Médicale. Saint-Germain**, Paris, v. 3, p. 253–254, 1971.

PASCUAL et al. Lippia: usos tradicionais, química e farmacologia: uma revisão. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201–214, 2001.

PERES, Lázaro E. P. **Metabolismo Secundário**. 2008. Disponível em: <<http://docentes.esalq.usp.br/lazaropp/FisioVegGradBio/MetSec.pdf>> Acesso em: Janeiro de 2012.

PRASAD, R.; SMRITI, S.L. Drug resistance in yeasts—an emerging scenario. *Adv Microb Physiol*, v. 46, p. 155–201, 2002.

RATTANACHAIKUNSOPON and PHUMKHACHORN, P. Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food Pongsak. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n 5, p. 614–619, 2010.

ROBLEDO, S. et al. In vitro and in vivo cytotoxicities and antileishmanial activities of thymol and hemisynthetic derivatives. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, p. 1652–1655, 2005.

RUIZ, A.L.T.G. et al. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Rev Bras Farmacogn**, v 15, p. 98–102, 2005.

SANGLARD D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **Lancet Infect Dis**, v. 2, p. 73–85. 2002.

SANTOS, H.S. et al. Cytotoxic Naphthoquinones from Roots of *Lippia microphylla* Cham. **Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 58, p. 5117–5120, 2003.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal Microbiology**. v.35. n.4. p.275–280, 2004.

SANCHEZ-GARCIA, M.D., et al. Novel polycaprolactone nanocomposites containing thymol of interest in antimicrobial film and coating applications. **Journal of Plastic Film and Sheeting**, v. 24, p. 239–251, 2008.

SHOEB, M. et al. Bioactivity of two Turkish endemic *Centaurea* species, and their major constituents. **Rev. Bras. Farmacogn**, v.17, p. 155–159, 2007.

SILVA, T.M.S. et al. Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn**, v.17, p. 35–38, 2007.

SILVA, Gabriela Carinhanha. ESTAQUIA E ESTIMULACAO QUIMICA DE *Lippia origanoides* KUNTH (VERBENACEAE). 2012. 90f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

SLOWING 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, Madrid. 1992

SUMNER, J. **The natural history of medicinal plants**. Portland: Timber Press, 2000.

TAMPIERI, M.P., et al. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. **Mycopathologia**, v. 159, p. 339-345, 2005.

TANG, S.Y.; HALLIWELL, B. Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 394, p. 1–5, 2010.

TERBLANCHÉ, F.C., KORNELIUS, G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae)-A literature review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, p. 471–485, 1996.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A., HARBORNE, J.B., SELF, R. Twelve 6-oxygenated flavone sulphates from *Lippia nodiflora* and *Lippia canescens*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2281–2284, 1987.

TYLER, V. E.; BRADY, L. R.; ROBBERS, J. E. **Pharmacognosy**. 9^a ed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1988.

ULTEE, A., BENNIK, M. H. J., AND MOEZELAR, R.: The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 1561–1568, 2002.

VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.

VELDHUIZEN, E.J.A. et al. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1874–1879, 2006.

VICUÑA, G.C.; STASHENKO, E.E.; FUENTES, J.L. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitoterapia*, v. 81, p. 343–349, 2010.

YOUDIM, K.A., DEANS, S.G. Effect of thyme oil and thymol dietary supplementation on the antioxidant status and fatty acid composition of the ageing rat brain. **British Journal of Nutrition**, v. 83, p. 87–93, 2000.

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

ZEYTINOGLU, H., INCESU, Z., BASER, KH. Inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human NRAS oncogene. **Phytomedicine**; v. 10, p. 292–299, 2003.

ANEXO

Anexo 1: Concentração dos seis principais componentes majoritários do óleo essencial de folhas e inflorescências de plantas cultivadas de *Lippia origanoides* Kunth submetidas a três pulverizações foliares com ácido giberélico (GA₃), 6-benzilaminopurina (BAP), ácido acetilsalicílico (AAS), ácido jasmônico (AJ), Stimulate[®] e água destilada (testemunha), e avaliadas em três épocas de colheita. Feira de Santana-BA, UEFS, 2012.

Tratamento	Épocas de coleta			Média	Tratamento	Épocas de coleta			Média
	1 ^a	2 ^a	3 ^a			1 ^a	2 ^a	3 ^a	
ρ-cimeno				Carvacrol					
GA ₃	7,85	8,21	9,12	8,39 ^a	GA ₃	47,23	47,02	42,06	45,44b
BAP	6,18	8,55	8,91	7,88 ^a	BAP	52,31	46,52	43,75	47,53a
AAS	7,33	7,82	8,93	8,03 ^a	AAS	49,14	45,40	44,85	46,46a
AJ	7,23	8,77	9,09	8,37 ^a	AJ	48,11	47,97	46,39	47,49a
Stimulate [®]	6,26	7,56	8,63	7,49 ^a	Stimulate [®]	53,20	47,80	43,12	48,04a
Testemunha	8,12	9,46	8,68	8,75 ^a	Testemunha	45,73	42,52	41,92	43,39b
Média	7,16B	8,40A	8,89A		Média	49,29A	46,21B	43,68C	
CV 1 (%)	11,17				CV 1 (%)	5,44			
CV 2 (%)	11,22				CV 2 (%)	5,77			
γ-terpineno				(E)-cariofileno					
GA ₃	9,61	9,57	10,34	9,84 ^a	GA ₃	4,58	4,97	5,09	4,88a
BAP	7,75	10,99	11,36	10,03a	BAP	4,29	4,56	4,49	4,45a
AAS	9,07	11,33	10,94	10,45a	AAS	4,33	4,88	4,56	4,59a
AJ	8,13	9,92	10,19	9,42 ^a	AJ	4,89	4,44	4,72	4,68a
Stimulate [®]	8,63	10,94	10,57	10,05a	Stimulate [®]	4,42	4,23	5,06	4,57a
Testemunha	10,16	10,17	10,14	10,16a	Testemunha	4,85	5,18	5,35	5,12a
Média	8,89B	10,49A	10,59A		Média	4,56A	4,71A	4,88A	
CV 1 (%)	9,47				CV 1 (%)	9,67			
CV 2 (%)	9,36				CV 2 (%)	9,29			
Timol				Biciclogermacreno					
GA ₃	3,72	3,75	3,19	3,56b	GA ₃	4,84	5,04	5,11	4,99a
BAP	4,39	3,90	3,39	3,90 ^a	BAP	4,06	4,35	4,79	4,40b
AAS	3,94	3,84	3,72	3,84 ^a	AAS	4,59	5,02	4,52	4,71b
AJ	3,90	3,93	3,66	3,83 ^a	AJ	5,17	4,89	4,53	4,60b
Stimulate [®]	5,08	4,32	3,53	4,31a	Stimulate [®]	4,09	4,36	5,46	4,64b
Testemunha	3,65	3,33	3,19	3,39b	Testemunha	4,91	4,87	5,34	5,04a
Média	4,11A	3,84A	3,45B		Média	4,61A	4,62A	4,96A	
CV 1 (%)	9,33				CV 1 (%)	7,22			
CV 2 (%)	9,29				CV 2 (%)	11,56			

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não apresentam diferença significativa segundo os testes estatísticos Scott-Knott e Tukey, respectivamente, a 5% de probabilidade de erro. CV 1: referente às parcelas (biorreguladores vegetais), CV 2: referente às subparcelas (época de coleta). (SILVA, 2012)