



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

ROSANA MATOS CARVALHO

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO E CITOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Lippia insignis Moldenke**

Feira de Santana - BA
Fevereiro, 2022

ROSANA MATOS CARVALHO

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO E CITOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Lippia insignis Moldenke**

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

Orientadora: Soraya Castro Trindade.

Coorientadora: Angélica Maria Lucchese.

Feira de Santana - BA

Fevereiro, 2022

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

Carvalho, Rosana Matos

C327p Potencial antimicrobiano e citotoxicidade do óleo essencial de *Lippia insignis* Moldenke. / Rosana Matos Carvalho. – 2022.

33 f.

Orientadora: Soraya Castro Trindade

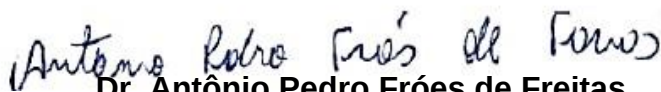
Coorientadora: Angélica Maria Lucchese

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Feira de Santana, 2022.

1 Lippia insignis. 2. Óleo essencial. 3. Atividade antimicrobiana.
4. Citotoxicidade I. Trindade, Soraya Castro, orient. II. Lucchese, Angélica
Maria, coorient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 582.949.28

BANCA EXAMINADORA



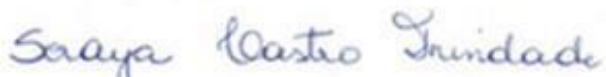
Dr. Antônio Pedro Fróes de Freitas

(Universidade Federal da Bahia)



Dr. Marcos da Costa Silva

(Universidade do Estado da Bahia)



Dr.ª Soraya Castro Trindade

(Universidade Estadual de Feira de Santana)

Orientadora e Presidente da Banca

Feira de Santana – BA

Fevereiro, 2022

*Dedico aos meus filhos,
Cláudio Terceiro e Elisa Matos*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proporcionar saúde e inteligência e não me desamparar nos momentos de dificuldade.

A minha mãe que sempre me apoiou e me ajudou em todos os momentos que precisei sem medir esforços.

A meus filhos, Cláudio e Elisa, que com toda certeza foram o meu incentivo para persistir, para não desviar o foco, para impulsionar.

Ao meu companheiro Alan por toda ajuda e compreensão nos momentos difíceis.

As professoras, Soraya, Angélica e Raquel, por toda ajuda e orientação, pela compreensão nos momentos difíceis durante a gestação e o pós em que precisei me ausentar.

A Rebeca Bulhosa e Andrezza Goes por terem me ajudado e me acompanhado na execução dos experimentos, eu aprendi muito com vocês e serei eternamente grata.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

RESUMO

O uso de óleos essenciais e extratos vegetais tem sido considerado uma alternativa aos medicamentos convencionais no combate a agentes infecciosos, principalmente devido ao aumento da resistência antimicrobiana. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de *L. Insignis* contra *Escherichia coli* (CCMB261), *Staphylococcus aureus* (CCMB263), *Salmonella sp.* (CCMB281) e *Bacillus cereus* (CCMB 282). A atividade inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais das folhas (OEF) e das inflorescências (OEI) de *L. insignis* foram avaliadas. Além disso, a toxicidade dos óleos foi testada em células mononucleares de sangue periférico humano. Os óleos essenciais das inflorescências de *Lippia insignis* apresentaram atividade antimicrobiana contra a bactérias *Bacillus cereus*. Já os óleos essenciais das folhas não apresentaram efeito antimicrobiano. Não houve citotoxicidade do OEI na concentração de 1,0 mg/mL (90,7% de viabilidade celular); concentrações de 2,0 mg/mL e 3,0 mg/mL foram levemente citotóxicas (84,7% e 77,3% de viabilidade, respectivamente). Todas as concentrações de OEF mostraram algum grau de citotoxicidade. O óleo essencial das inflorescências de *Lippia insignis* tem atividade contra *Bacillus cereus* e baixa toxicidade para células humanas, sendo promissor como agente antimicrobiano.

Palavras-chave: *Lippia insignis*. Óleo essencial. Atividade antimicrobiana. Citotoxicidade.

ABSTRACT

The use of essential oils and plant extracts has been considered as an alternative to conventional drugs to combat infectious agents, mainly due to the increase in antimicrobial resistance. The present study aimed to evaluate the antimicrobial activity of *L. Insignis* against *Escherichia coli* (CCMB261), *Staphylococcus aureus* (CCMB263), *Salmonella sp.* (CCMB281) and *Bacillus cereus* (CCMB 282). The minimal inhibitory activity (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of essential oils from leaves (OEF) and from inflorescences (OEI) of *L. insignis* were evaluated. In addition, the toxicity of the oils was tested on human peripheral blood mononuclear cells. In the MIC and CBM of 2.5 mg/mL. OEF had no antimicrobial effect. There was no cytotoxicity of OEI at the concentration of 1.0 mg/mL (90.7% of cell viability); concentrations of 2.0 mg/mL and 3.0 mg/mL were mildly cytotoxic (84.7% and 77.3% viability, respectively). All concentrations of OEF showed some degree of cytotoxicity. The use of essential oil from *Lippia insignis* inflorescences may be a viable alternative in the treatment of diseases caused by *Bacillus cereus*.

Keywords: *Lippia insignis*. Essential oil. Antimicrobial activity. Cytotoxicity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	9
2.1. Gênero <i>Lippia</i>	9
2.2. <i>Lippia insignis</i>	10
2.3. Óleos essenciais	11
2.4. Citotoxicidade.....	12
2.5. Microrganismos de importância clínica	13
3. REFERÊNCIAS.....	15
4. ARTIGO	20
4.1. Introduction	20
4.2. Material and methods.....	21
4.2.1. Essential oil collection and extraction	21
4.2.2. Blood collection and mononuclear cell separation (PBMC)	22
4.2.3. Evaluation of the cytotoxicity of essential oils from <i>Lippia insignis</i> Leaf (OEF) and from <i>Lippia insignis</i> inflorescence (OEI)	22
4.2.4. Assessment of antimicrobial activity	23
4.2.4.1 Activation of microorganisms.....	23
4.2.4.2. Inoculum standardization.....	23
4.2.4.3. Minimum inhibitory concentration (MIC)	23
4.2.4.4. Minimum bactericidal concentration (CBM)	24
4.2.5. Data analysis procedures	24
4.3. Results	24
4.4. Discussion	27
4.5. Conclusion.....	29
5. References	29
5. CONCLUSÃO GERAL.....	31

1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade brasileira é considerada uma das maiores do planeta com mais de 55.000 espécies de plantas catalogadas (GARCIA et al., 1996; LÓPEZ, 2006; SIMÕES et al., 2007). A região Nordeste, com predominância do bioma de caatinga, possui um grande potencial para bioprospecção, com muitas espécies endêmicas. Dentre os produtos fornecidos através da exploração dessa grande biodiversidade vegetal podemos destacar as ceras, o látex, fibras, alimentos e óleos essenciais (SAMPAIO et al., 2005). Pesquisas envolvendo as plantas presentes nesse bioma tem evidenciado a existência de importantes compostos químicos que podem ser utilizados no desenvolvimento de drogas terapêuticas (CALIXTO, 2003).

O gênero *Lippia* é um dos maiores da família Verbenaceae e o Brasil é o seu maior centro de diversidade com aproximadamente 75% das espécies descritas. Essa diversidade se concentra principalmente na cadeia do Espinhaço, em Minas Gerais e na Chapada Diamantina, Bahia (SALIMENA, 2000). Têm como nome popular o alecrim e são muito utilizadas na medicina tradicional. São plantas caracterizadas como arbustos ou subarbustos, ramosos, ou ervas perenes, geralmente aromáticos com glândulas presentes nas folhas. Suas folhas apresentam tricomas, onde ocorre a produção de seus óleos essenciais, principal responsável pelas suas propriedades medicinais (SALIMENA, 2000).

Este gênero possui em sua composição muitos compostos fenólicos e flavonoides, que caracterizam o seu poder antioxidante (AGUIAR; COSTA, 2005). Na medicina popular tem sido amplamente utilizado no tratamento de bronquite, resfriado e tosse (GOMES et al., 2011), estudos apontaram um potencial antimicrobiano (TRINDADE et al., 2021), no tratamento da doença periodontal (JUIZ et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2018), fungos filamentosos e atividade antifúngica contra cepas resistentes de *Candida* spp. (FARIAS et al., 2012), como o *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* (SOUZA et al., 2021). Também tem sido relatado uma atividade anti-carcinogênica, constatada pela presença do timol, carvacrol e p-cimeno (COSTA, 2019). Mais recentemente, foi demonstrada uma atividade imunomoduladora das espécies *Lippia alnifolia*, *Lippia organoides* e *Lippia thymoides* (BARRETO NETO, 2019; PEREIRA FILHO, 2019; PAIGE, 2017).

Lippia insignis Moldenke, nativa do Brasil e endêmica da Bahia é encontrada em domínios fitogeográficos de Caatinga, na região da Chapada Diamantina. Foram

encontrados no teor do seu óleo essencial principalmente monoterpenos: Eocimenona, limoneno e β -mirceno (BISPO et al., 2016), porém essa composição química pode mudar a depender da época da coleta, do ambiente, do solo e também da parte da planta utilizada para extração (ZOGHBI et al., 1998). Estudos anteriores já identificaram que o seu principal componente é o limoneno, este possui diversas atividades biológicas já comprovadas em outros óleos como inseticidas, repelentes e atividades fitotóxicas. Recentemente um estudo identificou em *Lippia insignis* o seu potencial como biocarrapaticida (SANTOS, 2017).

Tendo em vista que existem poucos estudos acerca das propriedades biológicas de *Lippia insignis* Moldenke o presente estudo pretende investigar o potencial antimicrobiano e a citotoxicidade do seu óleo essencial.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1. Gênero *Lippia*

Um dos principais gêneros que integram a família Verbenaceae com aproximadamente duzentas espécies distribuídas em países tropicais e subtropicais é a *Lippia* (COSTA et al., 2017). No Brasil, está localizada nos biomas da caatinga e cerrado, com maior visibilidade nos estados de Minas Gerais, Goiás e Bahia (FLORA DO BRASIL 2020). Geralmente são encontradas em substrato rupícola e terrícola em formas de ervas, arbustos, subarbustos e pequenas árvores (ALMEIDA et al., 2018). Embora seja considerada endêmica dessas regiões, algumas espécies se encontram em risco de extinção devido a mudança do habitat natural e ação antrópica (SALIMENA; MÚRGURA, 2015).

Dentro das espécies de *Lippia* é encontrada uma diversidade de compostos químicos com propriedades biológicas e farmacológicas. Para identificar esses compostos químicos, é realizado o processo de extração das partes vegetais que compreendem as folhas, flores, botões, frutos, sementes, ramos, cascas e raízes, originando-se, além dos extratos, os óleos essenciais (OLIVEIRA et al., 2018). Salienta-se que fatores ambientais como clima, solo e relevo e até as próprias técnicas de extração influem na composição e no rendimento dos metabólitos das plantas (SALIMENA; MÚRGURA, 2015).

Os constituintes presentes neste gênero são caracterizados como fenólicos e não fenólicos, a exemplo dos flavonoides, monoterpenos (linalol, timol, carvona, limoneno, p-cimeno e etc.), sesquiterpenos (β -cariofileno, ipsdienona e ocimenona), alcalóides, taninos, iridóides, esterol, saponinas, resinas e mucilagens (OKHALE et al., 2016). Alguns estudos realizados com esses constituintes mostram que os mesmos possuem ação antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana e anticancerígena (SAKAGAMI et al., 2019).

As espécies do gênero *Lippia* que possuem potencial terapêutico, foram listadas no Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde (2006), com a finalidade de criar fitoterápicos seguros e eficazes para o tratamento de doenças a partir do cultivo plantas, a serem disponibilizados para a população, de acordo com a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (SAUDE, 2009). Estudos demonstraram atividades antioxidante no combate a

radicais livres (SIQUEIRA-LIMA et al., 2017), antimicrobiana, sedativa (ZAMORA et al., 2018), antisséptica, antipirética, hipotensiva, espasmolítica, além de estar relacionada ao tratamento das desordens gastrointestinais e respiratórias (ALMEIDA et al., 2018).

Além da sua utilização em função das suas propriedades farmacológicas, a *Lippia* também é utilizada na ornamentação, em conservantes e repelentes, e na alimentação, inclusive nas indústrias (OKHALE et al., 2016). Sendo assim, as espécies deste gênero apresentam um valor relevante também na economia.

2.2. *Lippia insignis*

Lippia insignis é uma espécie do gênero *Lippia* nativa do Brasil, encontrada na região Nordeste, com maior visibilidade no estado da Bahia. Tem forma de arbusto de um a três metros de altura, aromático, estando presente na caatinga e nos campos rupestres, onde também é chamada de *Lantana hatschbachii* Moldenke (FLORA DO BRASIL, 2020). De acordo com livro de espécies ameaçadas de extinção da flora do Brasil, é considerada uma espécie vulnerável e sujeita ao seu desaparecimento por sofrer impacto antrópico (MARTINELLI; MORAES, 2013) e pela redução da qualidade do seu habitat, o que dificulta a sua manutenção no ambiente (FLORA DO BRASIL 2020).

Embora tenham sido relatados alguns dados relacionados ao seu cultivo, teor e rendimento dos compostos químicos (BISPO, 2015), bem como a sua atividade antimicrobiana e antifúngica (TRINDADE et al., 2021), esses dados ainda são incipientes. Sendo assim, por fazer parte do gênero *Lippia* sugere-se que a *Lippia insignis* apresente algumas moléculas químicas, como os compostos fenólicos, que possuem propriedades medicinais comuns, a exemplo dos efeitos antimicrobiano, antioxidante, sedativo, antisséptico, anti-inflamatório (BISPO et al., 2016).

Um estudo que realizou o isolamento dos compostos químicos de *Lippia insignis* relatou pela primeira vez um iridóide adoxosídeo no gênero, tornando a espécie uma nova fonte de moléculas bioativas (REIS, 2016). Neste panorama, a realização de estudos com o óleo essencial desta espécie é de grande relevância na tentativa de verificar o potencial desse novo composto, assim como sua toxicidade celular e atividade antimicrobiana, com o intuito de conquistar mais recursos para tratamentos e prevenções de muitas doenças, bem como de garantir a sobrevivência da espécie.

2.3. Óleos essenciais

Os óleos essenciais são produtos odoríferos de origem vegetal, que possuem constituintes químicos, as *Lippias* em especial, possuem principalmente constituintes voláteis, todavia outras substâncias como flavonóides, iridóides e naftoquinonas também são encontrados com frequência, do mesmo modo, os alcalóides, triterpenos e derivados de esteróides, normalmente denominados como saponinas são descritos. Já a composição química é dada basicamente pela classe dos terpenos, se destacando os monoterpenos e sesquiterpenos, nota-se que os componentes que aparecem com maior frequência são limoneno, β -cariofileno, p-cimeno, cânfora, linalool, α -pineno e timol (SIMOES et al., 2007).

Estudo recente no qual foi verificado a composição química de alguns óleos essenciais, foi observado que em relação a *Lippia insignis*, houve um predomínio de monoterpenos, onde os compostos majoritários destacados foram (E)-ocimenona, limoneno, β -mirceno e ep-cimeno (SANTOS et al., 2020). Já na espécie de *L. gracilis Schauer*, estudos mostraram a presença de carvacrol e p-cimeno como constituintes principais em Buíque e timol, γ -terpineno e 4-metoxi-acetofenona como compostos majoritários em Ouricuri (NEVES et al., 2008).

Atualmente os óleos essenciais têm sido amplamente estudados, por ser um produto natural, são bem aceitos pelos consumidores por não oferecerem riscos à saúde e por suas diversas propriedades terapêuticas, dentre as quais destacam-se as antibacterianas, antifúngicas, antiparasitárias, inseticidas e antioxidantes, assim como os compostos químicos presentes nos óleos essenciais das espécies do gênero *Lippia*, principalmente os monoterpenos, carvacrol e timol tem mostrado uma forte ação contra bactérias e fungos (SACCHETTI et al., 2005).

Além dessas propriedades, o óleo essencial da folha de algumas espécies de *Lippias* também tem demonstrado um efeito anti-hiperalgésico em dores de diversas origens, esse efeito anti-hiperalgésico pode estar relacionado ao seu perfil anti-inflamatório (especialmente na mitigação de citocinas pró-inflamatórias), com envolvimento da via da PKA e também pela inibição da corrente voltagem de Ca^{2+} , assim como a inibição do TNF- α parece ser fundamental para o seu perfil analgésico, trazendo assim uma nova ferramenta para o tratamento e manejo da dor crônica (SIQUEIRA-LIMA et al., 2019).

Os óleos essenciais podem ser extraídos através da hidrodestilação, extração

por solventes orgânicos, prensagem a frio, entre outros (SILVEIRA et al., 2012). Dentre os métodos mais utilizados em laboratórios temos a hidrodestilação por sua eficácia, custo baixo e por ser considerado ecologicamente correto, atendendo aos princípios da química verde (JESSOP, 2016). A quantidade, qualidade e composição do óleo extraído depende de muitos fatores como clima, da estação do ano, condições geográficas, período de colheita, técnica de destilação, solo, órgão da planta, estágio do ciclo vegetativo e idade (ANGIONI et al., 2006).

2.4. Citotoxicidade

Citotoxicidade é um fenômeno complexo *in vivo*, cuja expressão pode ser manifestada mediante a um amplo espectro de efeitos, que vão de alterações funcionais até a morte celular. A viabilidade celular retrata um dos parâmetros mais empregados para mensurar a citotoxicidade, que pode ser demonstrada por uma diversidade de técnicas, incluindo a utilização de corantes, como o MTT-tetrazólio (3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio), método confiável, de fácil reprodução e rápida execução (FRESHNEY, 1994).

Estudos realizados com extrato hidroalcolólico e óleo essencial da *Lippia G.* mostrou que o mesmo, apresentou atividade citotóxica e anti-proliferativa frente à célula de adenocarcinoma humano, evidenciando que a viabilidade celular observada pela redução do MTT para a linhagem nesse estudo, foi dose e tempo dependente, acarretando na citotoxicidade celular utilizando tanto o óleo quanto o extrato (COSTA, 2019).

Também foi observado através da técnica de MTT, estudos onde feito com óleo essencial de folhas de *Lippia M.* que não foi observada toxicidade em eritrócitos de camundongos até a dose de 250ug/mL, no mesmo estudo percebeu-se que apresentou moderada toxicidade *in vivo*, nas doses utilizadas, toxicidade esta, menor do que a comumente observada para antineoplásicos utilizados na prática médica (XAVIER, 2011).

No entanto, existem outras formas de mensuração da citotoxicidade, segundo SOUSA 2018, foi realizado um teste de citotoxicidade utilizando o método de *ArtemiasalinaLeach*, em uma das espécies de *Lippias*, onde as concentrações menores de 13,27 µg/mL⁻¹ foram consideradas com baixa toxicidade.

Já segundo TERCEIRO e OLIVEIRA 2020, para avaliar a citotoxicidade foi

utilizado um meio de avaliação das células do meristema das raízes em microscópio óptico de acordo com as fases do ciclo celular (interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase), através do sistema vegetal *Allium cepa*, onde foi observado em uma das espécies de *Lippia* que a infusão apresentou toxicidade sobre o sistema vegetal *Allium cepa* em todos os tratamentos, no entanto, nesse mesmo estudo foram realizados outros testes em que os autores puderam concluir que por ser uma planta medicinal, seu uso pode ser utilizado sem que apresente malefícios para as células, entretanto, as plantas medicinais como a *Lippia* S. podem conter alterações cromossômicas de acordo com a concentração.

Nesse sentido, torna-se necessário estudos, para que possa ser melhor elucidado quais as concentrações de fato, podem ser consideradas atóxicas, e com isso, seguras para aplicações e usos.

2.5. Microrganismos de importância clínica

As plantas medicinais apresentam uma enorme diversidade de substâncias com propriedades antimicrobianas, a maioria delas oriunda do seu metabolismo secundário, e têm sido analisadas como alternativa também para as drogas antimicrobianas (DUARTE, 2006). Destaca-se neste contexto o estudo dos óleos essenciais, responsáveis por grande parte das características biológicas das plantas medicinais e aromáticas, que podem se diversificar mesmo dentro da própria espécie (PEDROSA, 2012) e têm apresentado resultados promissores contra microrganismos, incluindo espécies de bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

Dentre as bactérias e fungos de importância clínica, é possível destacar *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Candida albicans*.

Escherichia coli é uma bactéria Gram negativa, anaeróbica facultativa, pertencente à família das Enterobacteriaceae. No hospedeiro debilitado ou imunossuprimido, ou quando as barreiras gastrointestinais são violadas, pode causar infecção, que pode se limitar às superfícies mucosas ou se disseminar por todo o corpo (BEUTIN et al., 1994).

Salmonella é um patógeno entérico que também pertence à família das Enterobacteriaceae, pode ser encontrada em uma variedade de hospedeiros, como em diversos tipos de animais e plantas, tem sido tradicionalmente considerada como

uma bactéria de origem alimentar que é transmitida através de carne e produtos animais contaminados bem como a água e solo, causando geralmente gastroenterite, no entanto, a maioria das infecções que resultam em gastroenterite não requer tratamentos antimicrobianos mas, a terapia antimicrobiana é necessária para pacientes muito jovens, muito idosos e imunocomprometidos que podem desenvolver infecções extra intestinais, como febre entérica, para evitar complicações adicionais, dentre os tipos de *Salmonella* existe a enterica sorovar Paratyphi, dentre outras (MARUS et al., 2019).

Staphylococcus aureus pertence à família Micrococcaceae. É uma bactéria esférica, gram-positiva, com aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóvel, não-esporulada e geralmente não-encapsulada. Apresenta-se em diversas formas: isolada, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupadas irregularmente (com aspecto semelhante a um cacho de uvas). Presente em diversas partes do corpo, como fossas nasais, garganta, intestinos e pele, podendo provocar doenças decorrentes da invasão direta dos tecidos, de bacteremia primária ou devido às toxinas que ele produz (BRAUNWALD et al., 2002).

Bacillus cereus são bactérias gram-positivas que pertencem ao filo Firmicutes, são bactérias formadoras de esporos, em forma de bastonete. Algum tempo atrás a *B. cereus* foi reconhecido como um contaminante alimentar comum, responsável por intoxicações, no entanto, *B. cereus* tem sido cada vez mais reconhecido como um agente etiológico de feridas localizadas e infecções oculares, bem como infecções sistêmicas, atualmente, várias exoproteínas com atividades enzimáticas, como proteases ou fosfolipases, têm sido discutidas como supostos fatores de virulência, contribuindo para a síndrome diarreica, síndrome essa, que tem sido bastante associada ao *B. cereus* (BONECA; EHLING-SCHULZ; VOGELMANN et al., 2013).

Candida albicans é uma espécie do gênero *Candida* e constitui o principal grupo de leveduras que causam infecções oportunistas nos seres humanos. É um fungo presente naturalmente no organismo, podendo ser normalmente encontrada em várias partes do corpo, sendo mais frequente na mucosa vaginal, cavidade oral, trato gastrointestinal e urinário. Este fungo pode se tornar patogênico em indivíduos com o sistema imunológico comprometido, causando doenças em vários órgãos e tecidos (DIGNANI et al., 2009).

Em relação a *Lippia insignis*, estudo recente mostrou que seus extratos metanólicos tem a capacidade de indução de formação de halos de inibição frente

às bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis*, além de apresentarem atividade antimicrobiana contra a bactéria *Micrococcus luteus*, assim como, demonstraram atividade antimicrobiana frente a levedura *C. Albicans* (TRINDADE et al., 2021).

O conhecimento da comunidade microbiana é bastante relevante para a compreensão da patogenia de algumas doenças e suas interações. Assim sendo, a busca por alternativas para o seu controle com o uso de produtos naturais, especialmente óleos essenciais tem se mostrado promissor para o tratamento de inúmeras doenças, além de tudo, cada região brasileira apresenta um amplo potencial a ser prospectado.

3. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R.R., et al. Chitosan nanogels condensed to ferulic acid for the essential oil of *Lippia origanoides* Kunth encapsulation. **Carbohydr Polym**, 188:268-275. 2018.
- ANGIONI, A., et al. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. **Journal of agricultural and food chemistry**, 54(12), 4364-4370. 2006.
- NETO, Laerte Oliveira Barreto. **Efeito imunomodulador e antimicrobiano dos extratos de Lippia alnifolia e Vatairea macrocarpa na periodontite**. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Feira de Santana. 2019.
- BEUTIN, L., et al. Fatores de virulência e características fenotípicas de cepas verotoxigênicas de *Escherichia coli* isoladas de pacientes humanos na Alemanha. **Med. Microbiol. Immunol.** (Berlim) 183 13 2. 1994.
- BISPO, L.P., et al. **Cultivo e produção de óleo essencial de Lippia insignis Moldenke ocorrente no Semiárido baiano**. In: II Simpósio da Rede de Recursos Genéticos Vegetais do Nordeste, 2015, Fortaleza. Anais do II Simpósio da RGV Nordeste. Fortaleza, Embrapa Agroindústria Tropical (R251). 2015.
- BISPO., et al. Effect of indolebutyric acid and cutting type on vegetative propagation of three *Lippia* species. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.46, n.8, p.1364- 1367. 2016.
- BONECA, V.M., EHLING-SCHULZ, M., VOGELMANN, R. Ação concertada de esfingomielinase e enterotoxina não hemolítica em *Bacillus cereus* patogênico. **PLoS One** 8 :e61404 10.1371/journal.pone.0061404. 2013.
- BOPP, C.A., et al. *E. scherichia*Shigella e Salmonella , p. 654-671. Em PR Murray, EJ Baron, JH Jorgensen, MA Pfaller e RH Tenen (ed.), **Manual of Clinic microbiology**, 8th ed., Vol. 1. ASM Press, Washington, DC. 2003.
- BOTELHO, M.A., et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Braz J Med Biol Res**. Mar;40(3):349-56. doi: 10.1590/s0100-879x2007000300010. PMID: 17334532. 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde - **Secretaria de Ciências, Tecnologia e Insumos**

Estratégicos. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 59 p. 2006.

BRAUNWALD, E., et al. Harrison Medicina Interna. 15. ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill. **Interamericana do Brasil.** 2002.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 5, n. 3, p. 37-39. 2003.

CHOI, J., HWANG, Y.,. Patent Keyword network analysis for improving technology development efficiency. **Technological forecasting & social change.** 2013.

COSTA, P.S., et al. Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero *Lippia* sensu lato (Verbenaceae). **Hoehnea**, 44(2):158-171. doi:10.1590/2236-8906-68/2016. 2017.

COSTA, S.E.L. **Atividade antiproliferativa e citotóxica do óleo essencial e extrato hidroalcóolico provenientes da *Lippia grata schauer*.** Universidade federal do rio grande do norte. Centro de biociências. Programa de pós-graduação em biologia parasitária. Dissertação de mestrado. Natal. 2019.

CNC Flora. **Lippia insignis Moldenke in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2** Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Lippia insignis Moldenke](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Lippia%20insignis%20Moldenke)>. Acesso em 26 setembro 2021.

DE FREITAS, A.L., BARTH, A.L. Antibiotic resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*: focus on imipenem. **Braz J Infect Dis**, v. 6, n. 1, p. 1-7. 2002.

DIGNANI, M.C., SOLOMKIN, J.S., ANAÏSSIE, E.J. Candida. In: Anaissie, EJ, McGinnis, MR, Pfaller MA. **Clinical Mycology.** 2nd ed., Amsterdam: Elsevier. 2009.

DUARTE, M.C.T. **Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Multiciência (ASSER),** Campinas SP, n.7. 2006.

FARIAS, E.M.F.G., et al. Antifungal activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) against clinical isolates of *Candida* species. **Journal of Herbal Medicine**, v. 2, p. 63-67. 2012.

FIRMO, W.C.A., et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cad. Pesq** v.18, p.90-95. 2011.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique.** 3ª ed. New York: WileyLiss, p. 486. 1994.

FLORA do Brasil 2020 em construção. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro.** Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 28 Maio. 2018.

GARCIA, E.S., et al. 1996. Fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O., et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 2.ed. Florianópolis: UFRGS. 821 p. 2000.

GOMES, S.V.F., NOGUEIRA, P.C.L., MORAES, V.R.S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, p. 64-77. 2011.

JESSOP, P.G. The use of auxiliary substances (e.g. solvents, separation agents) should be made unnecessary wherever possible and innocuous when used. **Green**

Chemistry.18, 2577. 10.1039/c6gc90039a. 2016.

JUIZ, P.J.L., et al. Essential oils and isolated compounds from *Lippia alba* leaves and flowers: Antimicrobial activity and osteoclast apoptosis. **International Journal of Molecular Medicine**;35(1):211–217. 2015.

LÓPEZ, C.A.A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, Boa Vista, v. 1, n. 1, p. 19-27. 2006.

MARUS, J.R., et al. Surtos de infecções por *Salmonella enterica* ligados ao contato animal: características demográficas e de surtos e comparação com surtos de origem alimentar-Estados Unidos, 2009–2014. **Zoonoses Saúde Pública** 66, 370 – 376. 2019.

NEVES I.A, OLIVEIRA, J.C.S., CAMARA, C.A.G. **J Essent Oil Res.** 20. 2008.

OCDE. **Manual de oslo: diretrizes para coleta e interpretação de dados sobre inovação**. 3º edição. Rio de Janeiro. FINEP. 2005.

OLIVEIRA, A.R.M.F. **Morfoanatomia, produção e composição química de óleo essencial e atividade biológica de quatro espécies nativas de Lippia**. Tese de doutorado (Programa de Pós graduação em Recursos Genéticos Vegetais) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana – Feira de Santana. 114 fl. 2014.

OLIVEIRA, T.B., et al. O uso da *Lippia* no tratamento das doenças periodontais. **J Dent Pub H.**,9(3):227-237. 2018.

OKHALE, S.E., et al. Phytochemistry and ethnopharmacology of *Lippia* genus with a statement on chemotaxonomy and essential oil chemotypes. **Int J Pharmacogn.**, 3(5):201-211. doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.IJP.3(5).201-211. 2016.

PAIGE, Eric-Lenn Michael. **Potencial antitumoral de espécies de Lippia (Verbenaceae)** do Estado da Bahia. 2017. 73 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2017.

PEDROSA, Rozangela Curi. **Avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT**. 2011.

PEDROSA, Flávia Pinho da Cunha. **Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas pertencentes à CPMA** - Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do CPQBA - UNICAMP. 2012.

FILHO, J.N P. **Avaliação dos efeitos imunomodulador e antimicrobiano dos extratos da Lippia thymoides na periodontite**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Feira de Santana. 2019.

REIS, F.A.A.D. **Prospecção química de Lippia insignis Moldenke (Verbenaceae)** / Francisco Alex Aragão dos Reis. 2016.

RIBEIRO B.G., et al. Influência do anabolizante decanoato de nandrolona sobre a viabilidade de células satélites musculares em processo de diferenciação. **Fisioter. Pesq.**, v. 21, n.1, p. 16-20. 2014.

SACCHETTI, G., et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**. 91. 621-632. 10.1016/j.foodchem.2004.06.031. 2005.

- Sakagami, H., et al. Recent Progress of Basic Studies of Natural Products and Their Dental Application. **Medicines**, 6(1):4. doi:10.3390/medicines6010004. 2019.
- SALIMENA, F.R.G., et al. Verbenaceae. Livro Vermelho da Flora do Brasil. CNC FLORA. **Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, p.399-405. 2013.
- SALIMENA, F.R.G., FRANÇA, F., SILVA, T.R.S. Verbenaceae. In: GIULIETTI, A. M.; et al (Org.). **Plantas Raras do Brasil**. 1. ed. Belo Horizonte: Conservação Internacional. p. 399- 401. 2009.
- SALIMENA, F.R.G. **Revisão taxonômica de Lippia sect. Rhodolippia Schauer (Verbenaceae)**. 1v. 562f. Tese (Doutorado em Botânica) - USP, São Paulo, São Paulo. 2000.
- SALIMENA, F.R.G., Múlgura, M.E. Notas Sobre O Gênero Lippia (Verbenaceae) No Brasil. **Bol. Bot.** Univ. São Paulo, São Paulo, v. 33, p. 45-49, 2015. DOI: 10.11606/issn.2316-9052.v33ip45-49 . 2015.
- SAMPAIO, E.V.S.B., et al. Espécies da flora nordestina de importância econômica potencial. Recife: **Associação Plantas do Nordeste-APNE**. 331 p. 2005.
- SANTOS, D., OLIVEIRA, L.M., LUCCHESI, A.M; ESPELETA, A.D.F., DA CRUZ, J.D., LORDELO, M.S. Insecticidal activity of essential oils of species from the genus Lippia against Nasutitermes corniger (Motschulsky) (Isoptera: Termitidae). **SOCIOBIOLOGY**, v. 67, p. 292. 2020.
- SANT'ANA, A., CONCEIÇÃO, C., AZEREDO, D.R.P. Comparação entre os métodos rápidos simplate R TPC- CI e petrifilm RAC e os métodos convencionais de contagem em placas para a enumeração de aeróbios mesófilos em sorvetes, **Brazilian Journal of Food Technology**, Vassouras, RJ, v. 6, n. 1, p.85-89. 2003.
- SANTOS, D.R. **Atividade inseticida de extratos e óleos essenciais de espécies do Gênero Lippia contra Callosobruchus maculatus (Fabricius, 1775) e Nasutitermes corniger (Motschulsky, 1855)**. Feira de Santana. 2017.
- SAÚDE, M.D. **Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Saúde, A. Brasília. 2009.
- SIMÕES, C.M.O., et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: UFRGS. 1102 p. 2007.
- SIQUEIRA-LIMA, P.S., et al. Anti-hyperalgesic effect of Lippia grata leaf essential oil complexed with β -cyclodextrin in a chronic musculoskeletal pain animal model: Complemented with a molecular docking and antioxidant screening. **Biomed Pharmacother.**, 91:739-747. doi:10.1016/j.biopha.2017.05.009. 2017.
- SIQUEIRA-LIMA, P.S., QUINTANS, J.S.S., HEIMFARTH, L., PASSOS, F.R.S., PEREIRA, E.W.M., REZENDE, M.M., MENEZES-FILHO, J.E.R., BARRETO, R.S.S., COUTINHO, H.D.M., ARAÚJO, A.A.S., MEDRADO, A.S., NAVES, L.A., BOMFIM, H.F., LUCCHESI, A.M., GANDHI, S.R., QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Involvement of the PKA pathway and inhibition of voltage gated Ca^{2+} channels in antihyperalgesic activity of Lippia grata/ β -cyclodextrin. **LIFE SCIENCES**, v. 239, p. 116961. 2019.
- SOUSA, J.B.G.D. **Atividade antioxidante, antimicrobiana e citotoxicidade do óleo essencial do gênero lippia spp**. Universidade federal de campina grande centro de ciências e tecnologia agroalimentar programa de pós-graduação stricto sensu em sistemas agroindustriais. Dissertação de mestrado. 2018.

SOUZA, R.V., et al. . Antifungal potential of essential oil constituents. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 12, p. e457101220537. 2021.

TAIZ, L., ZEIGER E. Fisiologia vegetal. 5.ed. Porto Alegre: **Artmed**. 918 p. 2013.

TERCEIRO, A.JD.M.D., MARIA A.S.O. **Evaluation of toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of infusion of leaves of lippia sidoides (verbenaceae)**. Revista Ciência e Estudos Acadêmicos de Medicina –Número 12. Universidade do Estado de Mato Grosso -UNEMAT (Cáceres) jan.-jul. (p. 71-82). 2020.

TRINDADE, S.C., et al. Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos de diferentes espécies do gênero Lippia. **Research, Society and Development**, 10(9), e22610918051-e22610918051. 2021.

WILLS, R.W., et al. Sinergismo entre o vírus da síndrome respiratória e reprodutiva porcina (PRRSV) e Salmonella Choleraesuis em suínos Veterinário. **Microbiol**. 2000.

XAVIER, A.L. **Estudo do potencial antitumoral do óleo essencial das folhas de Lippia Microphylla cham. (Verbenaceae) e sua toxicidade**. Dissertação de mestrado. João Pessoa. 2011.

ZAMORA, C.M.P., TORRES, C.A., NUÑEZ, M.B. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Verbenaceae species growing in South America. **Molecules**, 23(3):1-23. doi:10.3390/molecules23030544. 2018.

ZOGHBI, M.G.B., et al. Essential Oils of Lippia alba (Mill.) N. E. Br Growing Wild in the Brazilian Amazon. **Flavour And Fragrance Journal**, v. 13, p. 47-48. 1998.

4. ARTIGO

Normas da revista PLOS ONE | ISSN: 1932-6203

ANTIMICROBIAL POTENTIAL AND CYTOTOXICITY OF ESSENTIAL OIL FROM *Lippia insignis* Moldenke

Rosana Matos de Carvalho¹, Angélica Lucchese¹, Raquel Benevides¹, Rebeca Pereira Bulhosa Santos²,
Andreza Lôren de Góes Nascimento¹, Soraya Castro Trindade^{1,2 *}

¹Graduate Program in Biotechnology, Feira de Santana State University, Feira de Santana, Brazil

²Graduate Program in Immunology, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil

*Correspondence: soraya@uefs.br

Abstract

The use of essential oils and plant extracts has been considered as an alternative to conventional drugs to combat infectious agents, mainly due to the increase in antimicrobial resistance. The present study aimed to evaluate the antimicrobial activity of *L. Insignis* against *Escherichia coli* (CCMB261), *Staphylococcus aureus* (CCMB263), *Salmonella* sp. (CCMB281) and *Bacillus cereus* (CCMB 282). The minimal inhibitory activity (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of essential oils from leaves (OEF) and from inflorescences (OEI) of *L. insignis* were evaluated. In addition, the toxicity of the oils was tested on human peripheral blood mononuclear cells. In the MIC and CBM of 2.5 mg/mL. OEF had no antimicrobial effect. There was no cytotoxicity of OEI at the concentration of 1.0 mg/mL (90.7% of cell viability); concentrations of 2.0 mg/mL and 3.0 mg/mL were mildly cytotoxic (84.7% and 77.3% viability, respectively). All concentrations of OEF showed some degree of cytotoxicity. The use of essential oil from *Lippia insignis* inflorescences may be a viable alternative in the treatment of diseases caused by *Bacillus cereus*.

Keywords: *Lippia insignis*, essential oil, antimicrobial

4.1. Introduction

Medicinal plants are traditionally used as drugs in the treatment of various ailments, due to the characteristics associated with their compositions (SALIMENA; MULGURA, 2015). Essential oils and extracts reveal antimicrobial activities against various microorganisms, such as bacterium (SANTOS et al., 2020), yeasts and

filamentous fungi. These activities come from compounds from the secondary metabolism of plants, which have been considered as alternatives to antimicrobial drugs, as the number of infectious diseases and antimicrobial and antibiotic resistance have become increasingly greater (COSTA et al., 2017).

Among the plants with this potential, the *Lippia* species stand out, which act in specific metabolic or physiological activities in organisms, providing a reduction in bacterial loads (LIMA et al., 2014). This genus has an enormous geographic distribution, mainly in the semi-arid region of Bahia, being the second largest genus belonging to the Verbenaceae Family. It is composed of herbs, shrubs and small trees, standing out for its striking aroma (SOARES; TAVARES-DIAS., 2013).

One of the species within the genus, *Lippia insignis*, has been identified as a viable alternative for the treatment of both bacterial and fungal infectious diseases (TRINDADE et al., 2021). It is an aromatic bush from one to three meters in height, present in the caatinga and in the rupestrian fields. Its phenolic compounds seem to have antimicrobial, antioxidant, sedative, antiseptic and anti-inflammatory effects (SANTOS et al., 2016), but the literature is still scarce on activities related mainly to its essential oil.

In this perspective, the aim of this work is to identify the antimicrobial potential and cytotoxicity of *Lippia insignis* Moldenke essential oil.

4.2. Material and methods

4.2.1. Essential oil collection and extraction

The specimens of *Lippia insignis* Moldenke were collected on December 7th and 19th, 2020 in the germplasm bank of the Horto Florestal of the State University of Feira de Santana (UEFS), in the municipality of Feira de Santana, Bahia.

The leaves were separated from the inflorescences and stems for drying at room temperature and protected from light, and then pulverized in a knife mill. Extractions were performed using the hydrodistillation method, for 3 hours in a modified Clevenger. For the leaves, 115g were used for 2L of distilled water. For the inflorescences, in the first two extractions 85g were used for 1.7L of water and in the two following ones 62g were used for 1.3L of water. After being collected, the oil was dehydrated with anhydrous sodium sulphate to eliminate possible water residues. Subsequently, using

a Pasteur pipette, the oil was collected and placed in a glass bottle, labeled and stored in a commercial freezer at -23 °C. The percentage content of essential oil was calculated through the relationship between the volume of oil and the mass of leaves (V/m).

4.2.2. Blood collection and mononuclear cell separation (PBMC)

A volume of 20 mL of peripheral blood was collected from a healthy volunteer (CEP-UEFS: opinion 1.344.223/2015) by venipuncture in the antecubital fossa with a sterile vacuum tube (Vacutainer, BD-SP). The blood was diluted in 0.9% sodium chloride (saline solution), applied to a layer of FICOLL and subjected to centrifugation. The PBMC-enriched interface ring was collected, washed and resuspended in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) culture medium for counting in a Newbauer chamber under an optical microscope. The integrity of the cell membrane was determined using the trypan blue exclusion technique.

4.2.3. Evaluation of the cytotoxicity of essential oils from *Lippia insignis* Leaf (OEF) and from *Lippia insignis* inflorescence (OEI)

PBMC were distributed in 96-well plates in RPMI culture medium with 1% antibiotic/antimycotic and 10% fetal bovine serum. Essential oils from the leaves and inflorescences of *Lippia insignis* were diluted in DMSO and 3% methanol and added at different concentrations 50 mg/mL, 45 mg/mL, 40 mg/mL, 35 mg/mL, 30 mg/mL, 25mg/ml, 20mg/ml, 15mg/ml, 10mg/ml, 5mg/ml, 4mg/ml, 3mg/ml, 2mg/ml and 1mg/ml. After 48 h, the plate was removed and centrifuged at 1000 rpm for 5 minutes at 4°C. The supernatant was aspirated and 20 µl/well of the MTT-tetrazolium [3-(4,5-dimethylazol-2yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide)] solution (Invitrogen Thermo Fisher Scientific) at 12 nM was added. The cells were again incubated for 2 hours in a humid chamber at 37°C and 5% CO₂. Then, a new centrifugation at 1000 rpm for 5 minutes at 4°C was performed. The culture medium was then removed and 50 µl/well of dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Co., SP, BR) was added. The absorbance reading value was determined at the wavelength at 570 nm using a microplate reader. The test was carried out in quintuplicate. Compounds that allowed a cell viability greater than or equal to 90% would be considered non-toxic.

4.2.4. Assessment of antimicrobial activity

4.2.4.1 Activation of microorganisms

The microorganisms used in this study were obtained from the Collection of Culture of Microorganisms of Bahia at the State University of Feira de Santana (CCMB/UEFS). Standard strains of the following species were used: *Escherichia coli* (CCMB261), *Staphylococcus aureus* (CCMB263), *Salmonella sp.* (CCMB281) and *Bacillus cereus* (CCMB 282). All strains were replicated in Petri dishes with the culture medium Muller-Hinton Agar (AMH) and taken to a bacteriological incubator at 37°C for 24 hours for microbial activation and growth..

4.2.4.2. Inoculum standardization

Inoculum standardization was performed using the direct colony suspension method. About 5 colonies of each microorganism cultivated in Petri dishes with AMH medium were removed and transferred to a Falcon tube with 20 mL of sterile saline solution (0.85%), according to the recommendations of CLSI (2012), documents M02-A11 and M2-A8. The suspension was standardized by reading the spectrophotometer, at 625 nm, reaching a turbidity level 0.5 on the McFarland scale, using the sterile saline solution as zero. To obtain a solution with a stock concentration of 5 mg/ml, 0.005 g of *Lippia insignis* essential oil was weighed into a sterile microcentrifuge tube and diluted in 100 μ L of Tween 20 and 900 μ L of sterile Mueller-Hinton Broth.

4.2.4.3. Minimum inhibitory concentration (MIC)

The MIC test was performed in 96-well polystyrene plates, according to CLSI (2003) for *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* and *Salmonella sp.* with modifications. In plate cultivation, 100 μ L of Mueller Hinton medium were added and then, in triplicate, 100 μ L of the OEF sample were placed on the plate. 100 μ L of the mixture was removed for the following wells, already conditioned with 100 μ L of AMH, characterizing the serial dilution, until the twelfth well of each line. In the latter, the final 100 μ L was discarded. 20 μ L of the suspensions of microorganisms were added to each well, accounting for

a total volume of 120 μL per well at the end.

Sterility control was performed, as described below: a) Mueller Hinton culture medium was made with 100 μL ; b) of the solvents used in the samples with 100 μL of Tween 20 and 900 μL of AMH medium; c) AMH with 20 μL of inoculum and 10 μL of gentamicin 40 mg/mL. Positive control with the study inocula was also performed.

The plates were incubated in a bacteriological incubator at 37°C for 24h. After the incubation period, these were developed with 10 μL of Resazurin ($\text{C}_{12}\text{H}_6\text{NNaO}_4$) 0.01% in each well. The plates were reincubated at 37°C and the result read after 1h, the pink color being indicative of microbial growth and blue indicative of growth inhibition.

4.2.4.4. Minimum bactericidal concentration (CBM)

After 24 hours of microbial growth of the microplates to determine the minimum inhibitory concentration (MIC), the presence or absence of inoculum in the wells was verified, viewing against the light. From the wells where no apparent growth was seen, 20 μL were removed and poured into 2 Petri dishes with AMH, and with the aid of a cotton swab gently spreading the sample throughout the dish. These plates were incubated in an oven at 37°C for another 24 hours to later check for microbial growth to consider the concentration tested as bactericidal or bacteriostatic.

4.2.5. Data analysis procedures

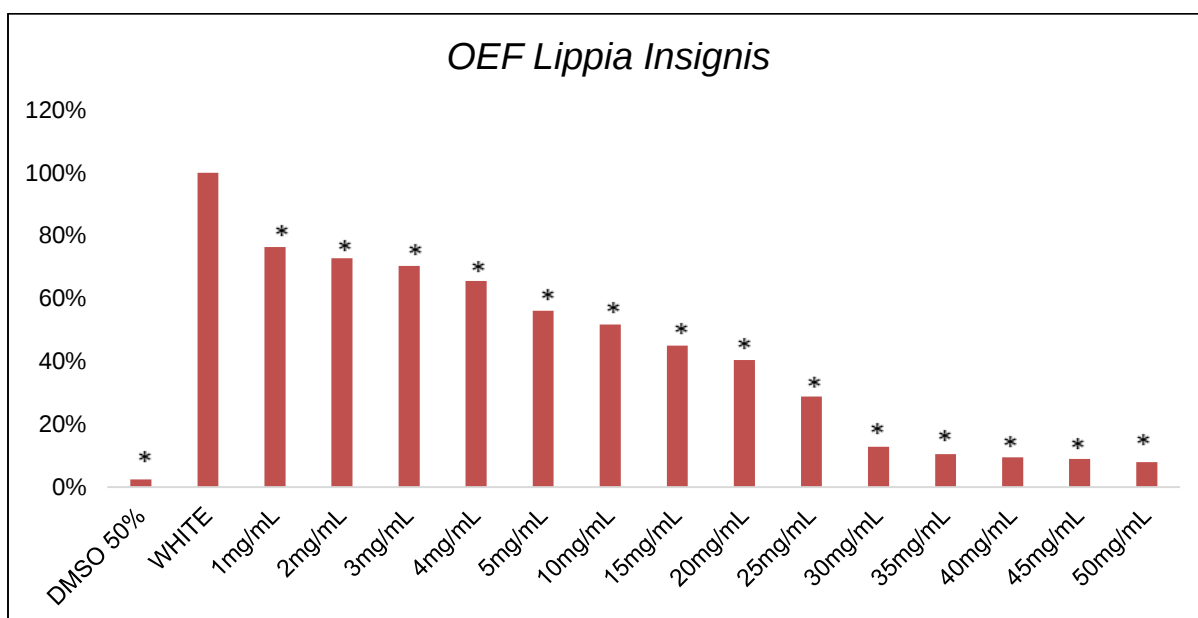
A descriptive analysis was performed to assess data related to tests to assess antimicrobial activity. Cytotoxicity data were submitted to the Kolmogorov-Smirnov test to determine normality. Then, the analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by Tukey's post-hoc, to assess the significant differences between the means ($p < 0.05$). The statistical program SPSS v.23 was used.

4.3. Results

The essential oil content of *Lippia insignis* leaves was 2.24% (V/m) and standard deviation of 0,16 and of the inflorescences was 1.95% (V/m) and standard deviation of 0,14.

Regarding cytotoxicity, only the concentration of 1mg/mL of oil from the inflorescences allowed a cell viability greater than or equal to 90%, being, therefore, considered as non-toxic. Comparison of absolute optical density values showed that this was the only concentration that did not differ statistically from the negative control (white), as shown in figure 1.

Figure 1: Cytotoxic effect of essential oil from *Lippia insignis* leaves (OEF) on peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Evaluation of cell viability of PBMC incubated with different concentrations of OEF for 48 h at 37°C and 5% CO₂ by the MTT-tetrazolium technique [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide)]. * $p \geq 0.05$. There was no statistically significant difference between the concentrations of 1mg/mL, 2mg/mL, 3mg/mL and 4mg/mL.

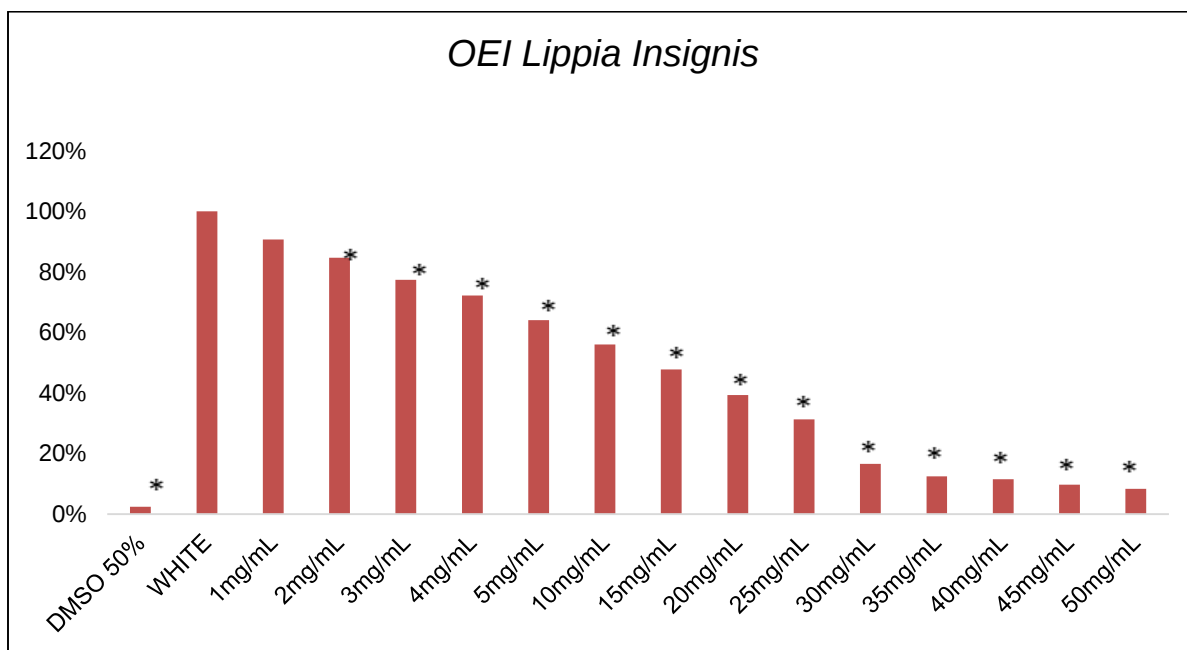


Concentrations of 2.0 mg/mL and 3.0 mg/mL determined cell viability of 84.7% and 77.3%, respectively. There was no statistically significant difference in cytotoxicity determined by concentrations of 1 mg/mL, 2 mg/mL and 3 mg/mL.

All OEF concentrations and the other OEI concentrations determined death of more than 10%, with a statistically significant difference in relation to the negative control (Figures 1 and 2). No statistically significant differences in cell toxicity were observed between the first four concentrations of OEF tested (1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL and 4 mg/mL).

From 15 mg/mL, all tested concentrations, both OEF and OEI, allowed cell viability below 50%, demonstrating cytotoxic potential (Figures 1, 2).

Figure 2: Cytotoxic effect of essential oil from *Lippia insignis* inflorescences (OEI) on peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Evaluation of cell viability of PBMC incubated with different concentrations of OEI for 48 h at 37°C and 5% CO₂ using the MTT-tetrazolium technique [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide)]. *p ≥ 0.05. There was no statistically significant difference between the concentrations of 1 mg/mL, 2 mg/mL and 3 mg/mL.



In the tests of antimicrobial activity, a minimal concentration of inhibition (MIC) of the growth of microorganisms in *B. cereus* was evidenced with the OEI of *Lippia insignis* at a concentration of 2.5 mg/mL (Table 1). The CBM at the same concentration was tested to corroborate the MIC result and the plates containing the OEI and OEF did not show bacterial growth, confirming their bactericidal potential.

OEI and OEF did not inhibit the growth of *Salmonella sp.*, *S. aureus* and *E. coli* at the concentrations that were tested. The highest concentration MBC (2.5 mg/mL) was performed on all microorganisms and after 24 hours there was bacterial growth in all plates.

Table 1. Minimum inhibitory concentration (mg/mL) and minimum bactericidal concentration (mg/mL) of essential oil from leaves and inflorescences (OEI) of *Lippia insignis* against clinically important microorganisms.

Microorganisms	OEF		OEI	
	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	2,5 mg/mL	2,5 mg/mL
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
<i>Salmonella sp.</i>	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-

OEF – essential oil from the leaf of *L. insignis*; OEI – essential oil from the inflorescence of *L. insignis*; (-) the microorganism grew normally, without inhibition by the samples

4.4. Discussion

The main finding of the present study points to an antimicrobial activity of the essential oil from the inflorescence of *Lippia insignis* against *B. cereus*, a *bacillus* of the Bacillaceae family, phylum Firmicutes, whose enterotoxins are associated with food poisoning (JOVANOVIĆ et al., 2021). The minimum inhibitory concentration observed, 2.5 mg/mL, seems not to have been completely innocuous to the organism, since in the cytotoxicity test the closest lowest concentration (2.0 mg/mL) determined a little more than 10% considered for the maintenance of cell viability (PERES et al., 2008).

However, the cell death rate of 15% and 23% observed with concentrations of 2.0 mg/mL and 3.0 mg/mL, combined with its statistical similarity with the only non-cytotoxic concentration (1.0 mg/mL), allows the intermediate concentration of 2.5 mg/mL to be considered only slightly cytotoxic (ISO 10993-5), justifying its use, highlighting a cell viability greater than or equal to 90%, it was considered as non-toxic.

As for the essential oil from the leaves of *L. insignis*, it had no antimicrobial effect, in addition to having demonstrated a greater cytotoxic effect when compared to the oil from the inflorescences. A previous study had already demonstrated this better

effectiveness of the inflorescence with regard to antioxidant activities, due to the presence of flavonoids that give the heart of flowers (PERES, 2015). The biological activities of *Lippia insignis* may be due to monoterpenes, the major compounds identified in this species, with thymol being one of the most abundant (OLIVEIRA et al., 2014). This compound has antibacterial, fungicidal and antioxidant activity, acting in the destruction of the structure and function of the microorganism's cell membrane (HELANDER et al., 1998).

Other species of *Lippia* have demonstrated antimicrobial activity against *B. cereus*, justifiable by the similar chemical composition between species belonging to the same genus. The essential oils of *L. chevalieri* and *L. multiflora*, which have thymol and p-cymene as major components, also showed a bactericidal effect against *B. cereus* (BASSOLE et al., 2003). As for the action against the other species studied, the findings of the present study were similar to those observed with the *Lippia alba* crude essential oil, which did not play a major antibacterial role (SANTOS et al., 2016). The essential oil from the leaf and stem of *L. subracemosa* and from the leaves of *L. morii*, all with main constituents of the monoterpene class, presented antimicrobial activity against *S. aureus* and *E. coli* (CASTRO, 2005).

The methanol extract of *Lippia insignis* showed better results against *E. coli* and *S. aureus*, inhibiting microbial growth at concentrations of 1 mg/mL and 0.25mg/mL, respectively, also presenting a bacteriostatic effect (TRINDADE et al., 2021). These divergences found may be related to differences in the chemical composition of the extract and essential oil samples. Furthermore, differences in the collection period, time and location can determine alterations in the plant's secondary metabolites, and consequently alter its antimicrobial activity (GOBBO-NETTO; LOPES, 2007).

This work allows us to start a more accurate study against the antimicrobial potential and cytotoxicity of *Lippia insignis*, considering the satisfactory results in the minimal inhibitory concentration against *B. cereus* and low cytotoxicity, this is an important bias to be explored as a potential therapeutic. As evidenced in other studies of several species of *Lippia*, chemical compositions can be altered due to different seasons, regions, water and nutrient availability, in addition, the synergism between major and secondary chemical components can also change the antimicrobial activity and the cytotoxic potential even in an essential oil of the same species (OUKERROU et al., 2017). Future studies with specific fractions of chemical components of this oil may reveal better biological activities against a greater diversity of microorganisms

4.5. Conclusion

The essential oil from *Lippia insignis* inflorescence at 2.5 mg/mL has low toxicity in human peripheral blood mononuclear cells and is capable of acting as an antimicrobial against *B. cereus*.

5. References

- 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**.n62. 2003.
- 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.
- COSTA, O.S., et al. Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero *Lippia* sensu lato (Verbenaceae). **Hoehnea** v. 44, n. 2 <https://doi.org/10.1590/2236-8906-68/2016>, 2017.
- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. Approved Standard—Eighth Edition. CLSI document M2-A8 (ISBN 1- 56238- 485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, 1908 - 1898, USA. 2003.
- Gobbo-neto, L., Lopes, N.P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**. 30, 374-381. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>. 2007.
- GOMIDE, M.D.S., et al. The effect of the essential oils from five different *Lippia* species on the viability of tumor cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia** [online]. V. 23, n. 6 [Accessed 17 December 2021] pp. 895-902. 2013.
- HELANDER, I.M., ALAKOMI, H.L., LATVA-KALA, K., MATTILA-SANDHOLM, T., POL I, S.E.J., GORRIS, L.G.M., WRIGHT, A.V. Characterization of the action of selected essential oil components on gram negative bacteria. **J. Agr. Food Chem**; 46:3590–3595. doi: 10.1021/jf980154m. 1998.
- JOVANOVIC, J., ORNELIS, V.F.M., MADDER, A., RAJKOVIC, A. *Bacillus cereus* food intoxication and toxicoinfection. **Compr Rev Food Sci Food Saf**. 20: 3719– 3761. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12785>. 2021.
- KLEIN G, RÜBEN C, UPMANN M. Antimicrobial activity of essential oil components against potential food spoilage microorganisms. **Curr. Microbiol**. 67, 200–208, 2013.
- LIMA, G.K., et al. **Óleo Essencial de *Lippia sidoides* nativas de Minas Gerais: Composição, estruturas secretoras e atividades antibacterianas**, p.: 664-671. 2014.
- MELO, J.O., FACHIN, A.L., RIZO, W.F., JESUS, H.C.R, ARRIGONI-BLANK, M.F., ALVES, P.B., BLANK, A.F. Cytotoxic effects of essential oils from three *Lippia gracilis* Schauer genotypes on HeLa, B16, and MCF-7 cells and normal human fibroblasts.

Genetics and Molecular Research, 13(2). 2691-2697. 2014.

OUKERROU, M.A, TILAOU, M., MOUSE, H.A., BOUCHMAA, N., ZYAD, A. Differential Cytotoxic Activity of Essential Oil of *Lippia citriodora* from Different Regions in Morocco. **Chem Biodivers** Jul;14(7). 2017.

OLIVEIRA, A.R.M.F.D. **Morfoanatomia, composição química e atividade biológica do óleo essencial de espécies nativas de Lippia**. 114 f. Tese (Doutorado Acadêmico em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 2014.

PERES, L.A.B., DELFINO, V.D.A., MOCELIN, A.J., TUTIDA, L.A., FAVERO, M.E., MATSUO, T. Standardization of MTT-Assay in a Cold Preservation Model as a Tool for Assessment of Kidney Cell Viability. **J Bras Nefrol**. 30/1:48-53. 2008.

PERES, L.E.P. **Metabolismo secundário das plantas**. Disponível em: <https://www.oleos essenciais.org/metabolismo-secundario-das-plantas/>. 2015.

SALIMENA, F.R.G., MULGURA, M. **Lippia in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15170>. 2015.

SANTOS, N., PASCON, R., VALLIM, M., FIGUEIREDO, C.R, SOARES, M.G, LAGO, J.H.G, SARTORELLI, P. Cytotoxic and Antimicrobial Constituents from the Essential Oil of *Lippia alba* (Verbenaceae). **Medicines**, 3(3):22. <https://10.3390/medicines3030022>. 2016.

SANTOS, R.P.B., CARVALHO-FILHO, P.C., SAMPAIO, G.P., SILVA, R.R., FALCÃO, M.M.L., PIMENTEL, A.C.M., OLIVEIRA, Y.A., MIRANDA, P.M., SANTOS, E.K.N., MEYER, R., XAVIER, M.T., TRINDADE, S.C. In Vitro Immunomodulatory Effect of Linalool on *P. gingivalis* Infection. **Global Journal of Medical Research: F Diseases** Volume 20 Issue 2 Version 1.0. Online ISSN: 2249-4618 & Print ISSN: 0975-5888. 2020.

SARRAZIN, S.L., DA SILVA, L.A., OLIVEIRA, R.B., et al. Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia origanoides* Kunth. **Lipids Health Dis**. 14:145. Published 2015 Nov 9. doi:10.1186/s12944-015-0146-7. 2015.

SOARES, B.V., TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu Potencial Bioativo e Importância na Medicina Veterinária e Aquicultura. **Biota Amazônia**, 3(1), 109–123. <https://doi.org/10.18561/21795746/biotaamazonia>. v3. n1. p109-123. 2013.

TRINDADE, S.C., et al. Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos de diferentes espécies do gênero *Lippia*. **Research, society and development**, v. 10, p. e22610918051. 2021.

5. CONCLUSÃO GERAL

O óleo essencial das inflorescências de *Lippia insignis* tem atividade contra *Bacillus cereus* e baixa toxicidade para células humanas, sendo promissor como agente antimicrobiano.