



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DANILO CÂNDIDO DE ARAÚJO BATISTA

Prospecção Fitoquímica e Avaliação das Atividades Antimicrobiana, Citotóxica e Anti-inflamatória de *Hyptis pectinata* (L.) Poit

Recife-PE

Setembro de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DANILO CÂNDIDO DE ARAÚJO BATISTA

Prospecção Fitoquímica e Avaliação das Atividades Antimicrobiana, Citotóxica e Anti-inflamatória de *Hyptis pectinata* (L.) Poit

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, na área de concentração: Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Bioativos.

PROF. DRA. MARIA NELLY CAETANO PISCIOTTANO

ORIENTADORA

Recife-PE

Setembro de 2015

Catálogo na fonte:
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

B333p Batista, Danilo Cândido de Araújo.
Prospecção fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica e anti-inflamatória de *Hyptis pectinata* (L.) Poit / Danilo Cândido de Araújo Batista. – Recife: o autor, 2015.
90 f.; il.; 30 cm.

Orientadora: Maria Nelly Caetano Pisciotano.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.
Inclui referências e apêndices.

1. Plantas medicinais. 2. Hyptis. 3. Terpenos. 4. Phenolic Compounds. 5. Antimicrobial. I. Pisciotano, Maria Nelly Caetano (orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2017 - 263)

DANILO CÂNDIDO DE ARAÚJO BATISTA

Prospecção Fitoquímica e Avaliação das Atividades Antimicrobiana, Citotóxica e Anti-inflamatória de *Hyptis pectinata* (L.) Poit

Aprovada em: 09/09/2015

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Nelly Caetano Pisciotano (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Karina Perrelli Randau (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Antonio Marcos Saraiva (Examinador Externo)
Faculdade São Francisco da Paraíba

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^ª. Dr^ª. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof^ª. Dr^ª. Ana Cristina Lima Leite

*A Maria Cândido (IM), minha avó,
que acabou nos deixando durante o
andamento deste processo. Eternas
saudades!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao Senhor Deus, pelo dom da vida e por guiar-me durante toda a caminhada até o cumprimento deste importante passo, sendo minha Fortaleza diante das adversidades.

À minha família, pai, mãe e meu irmão Daniel, por todo o incondicional apoio, companheirismo, amor e cumplicidade. Aos demais familiares por todo o estímulo e contribuição para que tudo se tornasse possível. A caminhada foi difícil, mas a presença de cada um sempre tornou os passos mais longos e me fortificava a cada tropeço.

-- Obrigado!

À minha noiva Márcia Juliana, meu porto seguro e fonte de inspiração, por todos os incentivos, companheirismo, amor e por participar de toda a minha formação profissional, desde o início da graduação até o término desta etapa. -- Amo-te!

A todos do Laboratório de Análises Microbiológicas, nas pessoas da Professora e amiga Nelly Caetano e do grande amigo Antonio Marcos Saraiva, que foram sem dúvidas, incentivadores de todo o meu desenvolvimento na Universidade. Aos companheiros de Laboratório Charles, Felipe, Ricardo e Edna, agradeço pelos vários momentos de descontração, trabalho, enorme ajuda e amizade durante estes 7 anos.

Ao Laboratório de Farmacognosia, nas pessoas da Profa. Dra. Karina Randau, do Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares, Rafaela Damasceno, Andrea e Bárbara por toda a ajuda no desenvolvimento dos experimentos e contribuição incondicional para que este trabalho pudesse existir.

À Profa. Dra. Teresinha Gonçalves, Profa. Dra. Gardênia Militão, Larissa Cardoso, Carlson Júnior e Jaciana Aguiar por toda a ajuda ao desenvolvimento do nosso projeto e contribuição junto ao Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental.

Aos amigos de LASOF por se fazerem presentes nos momentos de descontração, discussões políticas, café da tarde e por se fazerem presentes nos momentos difíceis de nosso trabalho.

Aos amigos e companheiros de turma de Graduação e Pós-Graduação e demais amigos (sem citar mais nomes para não esquecer), por toda a amizade que desenvolvemos ao longo do tempo e pelas presenças nas horas boas e ruins de nossas caminhadas.

Aos Mestres com quem pude aprender o necessário para tornar-me o que sou e a todos os grandes amigos e colegas do Departamento de Ciências Farmacêuticas, local onde criei fortes e importantes laços ao longo destes 7 anos em que lá estive presente.

À CAPES por todo o apoio financeiro destinado ao desenvolvimento do nosso projeto e aos que fazem o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF).

A todos vocês, meu **MUITO OBRIGADO POR TUDO!**

Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor,
seria como o metal que soa ou como o sino que tine.
E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e
toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que
transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.
E ainda que distribísse toda a minha fortuna para sustento dos pobres, e
ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, e não tivesse amor,
nada disso me aproveitaria.
O amor é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso; o amor não trata com
leviandade, não se ensoberbece,
Não se porta com indecência, não busca os seus interesses, não se irrita,
não suspeita mal;
Não folga com a injustiça, mas folga com a verdade;
Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.
O amor nunca falha; mas havendo profecias, serão aniquiladas; havendo
línguas, cessarão; havendo ciência, desaparecerá. (...)

1 Coríntios 13: 1-8.

RESUMO

Os produtos naturais têm sido amplamente utilizados para o tratamento de doenças em medicina popular e, com base nesta tradição, o uso de medicamentos produzidos a partir de plantas tem se tornado cada vez mais comum. Dentre as espécies com importantes propriedades medicinais, está *Hyptis pectinata* (L.) Poit, conhecida popularmente como “Sambacaitá” ou “Canudinho”, utilizada na medicina popular como anti-inflamatória e antisséptica, contra problemas gástricos ou respiratórios, câncer, infecções e febre. Sendo assim, objetivou-se nesse trabalho, analisar o perfil fitoquímico de extratos obtidos das folhas de *H. pectinata* L., obter e caracterizar o óleo essencial das folhas e executar uma triagem farmacológica, visando uma avaliação preliminar do potencial antimicrobiano, citotóxico e anti-inflamatório dos extratos obtidos. Inicialmente, 40g da droga vegetal foram submetidos à extração em diferentes solventes de polaridades distintas e crescentes (hexano, acetato de etila, etanol e água), pela técnica de Soxhlet, com ciclos de seis horas. Em seguida, por meio da técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), realizou-se a triagem fitoquímica de cada um dos 4 extratos obtidos, identificando-se os grupos de metabólitos secundários. Por meio de extração por hidrodestilação em Clevenger, obteve-se o óleo essencial das folhas de *H. pectinata*, calculou-se o rendimento e foi realizada sua caracterização do óleo por Cromatografia acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM). Posteriormente, avaliou-se a atividade antimicrobiana frente isolados clínicos e cepas ATCC Gram-positivas e Gram-negativas e fungos leveduriformes, através da técnica de poços/difusão em Agar e da Concentração Mínima Inibitória (CMI) por microdiluição em Agar. Além disso, foram investigadas as atividades citotóxica e anti-inflamatória dos extratos, sendo a primeira avaliada frente três linhagens de células cancerígenas e a segunda, por meio da inibição da produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos RAW 264.7. A partir da triagem fitoquímica, evidenciou-se a presença de mono e sesquiterpenos, triterpenos e esteroides, flavonoides, cumarinas e taninos hidrolisáveis e condensados. A extração do óleo essencial forneceu rendimento de 0,11% (v/p) e sua caracterização identificou 14 constituintes, sendo estes apenas sesquiterpenos e apresentando como compostos majoritários, o Beta-Cariofileno e o Germacreno-D. Quanto aos ensaios da atividade antimicrobiana, os melhores resultados foram frente cepas Gram-positivas, porém houve discreta atividade frente às Gram-negativas e nenhuma atividade antifúngica. Ainda com relação à atividade antimicrobiana, os extratos considerados mais ativos foram o acetato de etila e o aquoso, o que pode estar relacionado à maior presença de compostos fenólicos em ambos, de terpenos no extrato acetato de etila e à predominância de saponinas no extrato aquoso. Quanto à atividade citotóxica, destacaram-se as inibições frente duas das linhagens utilizadas, HEp-2 (Carcinoma de laringe) e HT-60 (Leucemia), pelos extratos hexânico e acetato de etila. A inibição frente à linhagem NCI-H-292 (Carcinoma de pulmão) foi moderada para ambos os extratos. Sugere-se então, que a inibição do crescimento tumoral do extrato hexânico de *Hyptis pectinata* esteja associada com a presença de estruturas terpênicas, enquanto o potencial de inibição do extrato acetato de etila, sugere-se que haja um sinergismo entre os compostos fenólicos e os terpenos. Com relação à avaliação do potencial anti-inflamatório, todos os extratos reduziram substancialmente os níveis de NO em todas as concentrações testadas, quando comparados aos resultados obtidos pelos macrófagos controles, apresentando inibição crescente, conforme foram aumentadas as concentrações. Os resultados obtidos neste estudo referente à espécie *Hyptis pectinata*, comprovam cientificamente algumas propriedades conhecidas pela medicina popular e fornecem perspectivas quanto aos futuros estudos envolvendo a espécie.

Palavras-chaves: Plantas Medicinais. *Hyptis*. Terpenos. Compostos Fenólicos. Antimicrobiana.

ABSTRACT

Natural products have been widely used for the treatment of diseases in folk medicine and, based on this tradition, the use of medicines produced from plants has become increasingly common, given the great biodiversity that exists in Brazil. Among the species with important medicinal properties is *Hyptis pectinata* (L.) Poit, popularly known as "Sambacaitá" or "Canudinho", used in popular medicine as anti-inflammatory and antiseptic, against gastric or respiratory problems, cancer, infections and fever. The objective of this work was to analyze the phytochemical profile of extracts obtained from the leaves of *H. pectinata* L., to obtain and characterize the essential oil of the leaves and perform a pharmacological screening, aiming at a preliminary evaluation of the antimicrobial, cytotoxic and potential anti-inflammatory of the extracts obtained. Initially, 40g of the plant drug were subjected to extraction in different solvents of different and increasing polarities (hexane, ethyl acetate, ethanol and water) by Soxhlet extractor, with cycles of six hours. Then, by Thin Layer Chromatography (TLC), the phytochemical screening of each of the 4 extracts was performed, identifying the groups of secondary metabolites. The essential oil from the leaves of *H. pectinata* was obtained by hydrodistillation in Clevenger, the yield was calculated and the oil characterization was performed by Chromatography coupled to Mass Spectrometer (GC-MS). Subsequently, antimicrobial activity against clinical isolates and Gram-positive and Gram-negative ATCC strains and yeast fungi were evaluated by means of wells / diffusion in Agar and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by agar microdilution. In addition, the cytotoxic and anti-inflammatory activities of the extracts were investigated, the first being evaluated against three cancer cell lines and the second, by inhibition of the production of nitric oxide (NO) in macrophages RAW 264.7. From the phytochemical screening, the presence of mono and sesquiterpenes, triterpenes and steroids, flavonoids, coumarins and hydrolysable and condensed tannins were evidenced. The extraction of the essential oil yielded a yield of 0.11% (v/w) and its characterization identified 14 constituents, these being only sesquiterpenes and presenting as major compounds Beta-Cariophyllene and Germacrene-D. As for the antimicrobial activity tests, the best results were on Gram-positive strains, but there was discrete activity against Gram-negative and no antifungal activity. In addition to the antimicrobial activity, the most active extracts were ethyl acetate and aqueous, which may be related to the higher presence of phenolic compounds in both, terpenes in the ethyl acetate extract and the predominance of saponins in the aqueous extract. As for the cytotoxic activity, the inhibition of the two strains used, HEp-2 (laryngeal Carcinoma) and HT-60 (Leukemia), by the hexane and ethyl acetate extracts were highlighted. Inhibition against the NCI-H-292 (Carcinoma of the lung) lineage was moderate for both extracts. It is suggested, then, that the inhibition of the tumor growth of the hexanic extract of *Hyptis pectinata* is associated with the presence of terpene structures, while the inhibitory potential of the ethyl acetate extract, it is suggested that there is a synergism between the phenolic compounds and the terpenes. Regarding the evaluation of the anti-inflammatory potential, all the extracts substantially reduced the NO levels at all the concentrations tested, when compared to the results obtained by the control macrophages, presenting increasing inhibition, as the concentrations were increased. The results obtained in this study concerning the species *Hyptis pectinata* scientifically prove some properties known by popular medicine and provide perspectives regarding future studies involving the species.

Keywords: Plants Medicinal. *Hyptis*. Terpenes. Phenolic Compounds. Antimicrobial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Mapa de distribuição da família Lamiaceae no mundo.	23
Figura 2	Mapa de distribuição do gênero <i>Hyptis</i> Jacq. no mundo	24
Figura 3	<i>Hyptis pectinata</i> em seu hábitat e seus diferentes órgãos: folhas, caule e flores	25
Figura 4	Pectinolídeos A(1), B(2) e C(3)	31
Figura 5	Incidência de Câncer no mundo em 2012.	39
Figura 6	Mortalidade por Câncer em ambos os sexos, em 2012.	40
Figura 7	Estimativas para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária.	41
Figura 8	Estruturas químicas dos componentes do óleo essencial de <i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	57
Figura 9	Comparação entre os percentuais de inibição dos extratos brutos de <i>Hyptis pectinata</i> testados frente linhagens de células neoplásicas.	72
Figura 10	Avaliação da atividade inibitória do extrato bruto hexânico de <i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit	73
Figura 11	Avaliação da atividade inibitória do extrato bruto acetato de etila de <i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit	74
Figura 12	Avaliação da atividade inibitória do extrato bruto etanólico de <i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit	75
Figura 13	Avaliação da atividade inibitória do extrato bruto aquoso de <i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição geográfica, nome popular e etnofarmacologia de <i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	26
Tabela 2	Sistemas cromatográficos, padrões e reveladores empregados na prospecção fitoquímica de <i>Hyptis pectinata</i> L. Poit.	46
Tabela 3	Cepas Gram-positivas utilizadas nos ensaios e suas respectivas origens	48
Tabela 4	Cepas Gram-negativas utilizadas nos ensaios e suas respectivas origens.	48
Tabela 5	Fungos leveduriformes utilizados nos ensaios e suas respectivas origens	49
Tabela 6	Prospecção fitoquímica dos extratos brutos de <i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	54
Tabela 7	Composição química do óleo essencial de <i>Hyptis pectinata</i>	56
Tabela 8	Atividade antimicrobiana do extrato hexânico de <i>Hyptis pectinata</i> frente cepas de interesse clínico	61
Tabela 9	Atividade antimicrobiana do extrato acetato de etila de <i>Hyptis pectinata</i> frente cepas de interesse clínico	64
Tabela 10	Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de <i>Hyptis pectinata</i> frente cepas de interesse clínico	66
Tabela 11	Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de <i>Hyptis pectinata</i> frente cepas de interesse clínico	69
Tabela 12	Resultados da Atividade Citotóxica dos Extratos das Folhas de <i>Hyptis pectinata</i> L. expressos em porcentagem de inibição da viabilidade celular	71

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Fluxograma de extrações e respectivas massas de extratos obtidos	45
------------------	------------------------------------------------------------------	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt – Acetato de Etila

AM – Coleção de Culturas do Laboratório de Análises Microbiológicas – Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPE

ATCC - American Type Culture Collection

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada a Espectro de Massas

CMI – Concentração Mínima Inibitória

CL₅₀ - Concentração letal que causa a morte de 50%

DL₅₀ - Dose que mata 50% ou mais dos animais-teste

DMSO – Dimetilsulfóxido

ESBL - Beta-lactamases de espectro estendido

EtOH - Etanol

ExtHex-*Hp* – Extrato Hexânico de *Hyptis pectinata* (L.) Poit

ExtAcOEt-*Hp* - Extrato Acetato de Etila de *Hyptis pectinata* (L.) Poit

ExtEtOH-*Hp* - Extrato Etanólico de *Hyptis pectinata* (L.) Poit

ExtAq-*Hp* - Extrato Aquoso de *Hyptis pectinata* (L.) Poit

HCT-8 – Linhagem celular de câncer de colo de útero

HEp -2– Linhagem de carcinoma de laringe

HL-60 – Linhagem de leucemia pró-mielocítica

HPV – Papiloma Vírus Humano

IK - Índice de Retenção de Kovats

INCA – Instituto do Câncer

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

IPA - Empresa Pernambucana de Pesquisas Agropecuárias

IRAS - Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde

ITU - Infecções do Trato Urinário

KPC - *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase

LPA - Leucemia Promielocítica Aguda

LPS – Lipopolissacarídeos

MeOH – Metanol

MRSA - *Staphylococcus aureus* meticilina resistente

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazólio

mg/mL – Miligrama por mililitro

mM – Milimolar

NCI-H-292 – Linhagem de Carcinoma de pulmão

NO – Óxido Nítrico

OE – Óleo Essencial

ppm – Partículas por milhão

SCN - *Staphylococcus* coagulase negativo

SCT - Síndrome do Choque Tóxico

UFC/mL - Unidades Formadores de Colônias por mililitro

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

UTIN - Unidades de Terapia Intensiva Neonatal

U/ml – Unidades por mililitro

VISA – *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à Vancomicina

VRSA – *Staphylococcus aureus* Resistentes à Vancomicina

μM – Micromolar

μg/mL – Micrograma por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
2.1 <i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	23
2.1.1 Aspectos Botânicos	27
2.1.2 Aspectos Químicos.....	27
2.1.3 Óleo essencial	27
2.1.4 Flavonoides e Fenilpropanoides	28
2.1.5 Outros componentes.....	28
2.2 Aspectos Farmacológicos	28
2.2.1 Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória	28
2.2.2 Atividade antibacteriana.....	29
2.2.3 Atividade antifúngica	30
2.2.4 Atividade antiparasitária	30
2.2.5 Atividade citotóxica	31
2.2.6 Atividade inseticida	32
2.2.7 Atividade moluscicida	32
2.2.8 Atividade no Sistema Nervoso Central.....	32
2.2.9 Outras atividades.....	33
2.3 Toxicidade	33
2.4 Microrganismos de interesse clínico	33
2.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	34
2.4.2 <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo (SCN)	35
2.4.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
2.4.4 <i>Enterobacteriaceae</i>	37
2.4.5 <i>Candida</i> spp.	38
2.5 Câncer.....	38
2.5.1 Epidemiologia do Câncer	39
3.1. OBJETIVO GERAL.....	43
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
4 METODOLOGIA.....	45
4.1 Coleta do material vegetal.....	45

4.2	Obtenção dos extratos	45
4.3	Triagem Fitoquímica	46
4.4	Extração do Óleo Essencial (OE)	47
4.4.1	Cálculo do rendimento do óleo essencial	47
4.4.2	Caracterização do óleo essencial por CG-EM	47
4.5	Atividade antimicrobiana	48
4.5.1	Microrganismos	48
4.5.2	Preparação dos inóculos.....	49
4.5.3	Preparação dos padrões antimicrobianos e dos extratos	49
4.5.4	Técnica de poços / Difusão em Agar	49
4.5.5	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) por microdiluição em caldo	50
4.5.6	Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de <i>Hyptis pectinata</i>	50
4.6	Ensaio da atividade citotóxica	51
4.7	Avaliação da capacidade inibitória na produção de óxido nítrico em RAW 264.7	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.1	Prospecção Fitoquímica	54
5.3	Análise do óleo essencial de <i>Hyptis pectinata</i>	55
5.3.1.	Rendimento do óleo essencial de <i>Hyptis pectinata</i>	55
5.3.2	Análise química do óleo essencial de <i>Hyptis pectinata</i>	55
5.2	Atividade antimicrobiana dos extratos de <i>Hyptis pectinata</i>	59
5.2.1	Atividade antimicrobiana do Extrato hexânico de <i>Hyptis pectinata</i> (ExtHex- <i>Hp</i>).....	59
5.2.2	Atividade antimicrobiana do extrato acetato de etila de <i>Hyptis pectinata</i> (ExtAcOEt- <i>Hp</i>)	62
5.2.3	Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de <i>Hyptis pectinata</i> (ExtEtOH- <i>Hp</i>).....	65
5.2.4	Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de <i>Hyptis pectinata</i> (ExtAq- <i>Hp</i>)	68
5.4	Avaliação da atividade citotóxica preliminar de <i>Hyptis pectinata</i>	70
5.4.1	Atividade citotóxica	70
5.5	Atividade anti-inflamatória de <i>Hyptis pectinata</i>	72
6	CONCLUSÃO.....	78
	REFERÊNCIAS.....	80

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos e são consideradas uma via para a descoberta de novas drogas, devido ao fácil acesso e ao custo relativamente baixo, uma vez que elas naturalmente crescem em abundância relativa (RIMBACH, 2009).

A Prospecção de materiais biológicos em plantas, encontradas em áreas de grande biodiversidade em regiões tropicais e subtropicais do Brasil, proporciona uma diversidade química para o desenvolvimento de novas drogas. Diante disso, o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos padronizados com eficácia e segurança de uso comprovadas é uma importante fonte para aumentar o acesso das pessoas aos tratamentos e oferecer novas opções terapêuticas (LIMA, 2011).

Diversos fármacos, tais como os analgésicos de ação central (morfina e codeína), glicosídeos cardiotônicos (digoxina e digitoxina) e antimicrobianos, foram isolados a partir de espécies vegetais, demonstrando a uma real possibilidade de novos fármacos. Apesar da grande biodiversidade brasileira, durante os últimos 20 anos, os fármacos de origem natural que apareceram no mercado foram quase que na totalidade, oriundos das pesquisas científicas de países como China, Coréia e Japão, evidenciando a existência de uma enorme lacuna entre a oferta de plantas e as poucas pesquisas (FOGLIO, 2006).

A região Nordeste do Brasil, como o resto do país, apresenta uma grande diversidade de espécies nativas que são conhecidas pelas suas propriedades medicinais e que são de uso comum na medicina popular. Dentre as que são utilizadas, estão as pertencentes ao gênero *Hyptis* Jacq. , o qual possui várias espécies que são usadas na medicina popular como anti-inflamatórias, antinociceptivas, anticonvulsivantes e antiulcerogênicas (BISPO, 2001), incluindo *Hyptis pectinata*, *Hyptis mutabilis*, *Hyptis fruticosa* e *Hyptis suaveolens* (RAYMUNDO, 2011).

No Brasil, *Hyptis pectinata* é muito valorizada por suas propriedades anti-inflamatória e antisséptica; sendo sua principal forma de utilização popular a ingestão de chás (infusões e decocções), para as mais diversas indicações, tais como: problemas gástricos ou respiratórios, câncer, infecções, febre, assim como, é muito usada sob a forma de bochechos, contra afecções da cavidade oral, e emplastro, contra doenças de pele (LIRA, 2006; CARVALHO, 1999).

Sendo assim, diante da vasta utilização de *Hyptis pectinata* na medicina popular e da pouca quantidade de estudos realizados com a espécie, a busca de novas alternativas terapêuticas faz-se necessária, ainda mais no que diz respeito à problemática da multirresistência bacteriana e do câncer, principalmente no que concerne ao risco de morbimortalidade e nos gastos anuais estimados para o tratamento (muitas vezes paliativo) destes problemas.

REFERENCIAL TEÓRICO

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Hyptis pectinata* (L.) Poit.

A família Lamiaceae possui aproximadamente 300 gêneros e 7.500 espécies distribuídas nos diferentes continentes. Muitas das suas plantas são cultivadas em hortas e jardins, e todas possuem um odor intenso, decorrente da presença de óleos essenciais em suas folhas e flores (MALAQUIAS et al., 2014). Além disso, é formada por plantas herbáceas a arbustivas, principalmente, que se caracterizam por apresentar caule e ramos tetragonares, quando jovens, flores fortemente zigomorfas, bilabiadas, e ovário com estilete ginobásico. Possui distribuição cosmopolita, ocorrendo principalmente em savanas abertas e regiões montanhosas de clima tropical a subtropical (BASÍLIO et al., 2006), conforme Figura 1. No Brasil, a família está representada por 34 gêneros e 498 espécies (HARLEY et al., 2010; SILVA, 2012).

Figura 1. Mapa de distribuição da família Lamiaceae no mundo



(Fonte: <<http://www.tropicos.org/Name/42000291?tab=maps>>; acesso em: 24 de março de 2015)

A família Lamiaceae tem grande importância econômica por ser fonte de óleos essenciais aromáticos, voláteis e de plantas ornamentais. Muitas espécies são utilizadas como condimentos importantes em culinária, sendo apreciadas pelo aroma ou pelo sabor que fornecem aos alimentos. As espécies da família Lamiaceae estão reunidas em oito subfamílias, incluindo a subfamília Nepetoideae (Dumort.) Luer., que subdivide-se em quatro tribos, dentre elas Ocimeae Dumort., que por sua vez subdivide-se em cinco subtribos, sendo uma delas Hyptidinae Endl., onde está posicionado o gênero *Hyptis* (FALCÃO; MENEZES, 2003).

O gênero *Hyptis* Jacq. possui grande variedade quanto ao hábito de suas espécies, sendo desde ervas, arbustos e subarbustos a pequenas árvores (KRÖEFF et al., 2002). Dentre as espécies que se destacam neste gênero estão: *H. pectinata*, *H. suaveolens*, *H. capitata*, *H. verticillata*, *H. spicigera*, *H. mutabilis*, *H. albida*, *H. emoryi*, *H. crenata*, *H. romboides*, *H. umbrosa*, *H. salzmanii*, *H. fruticosa*, *H. lanceolata*, *H. oblongifolia*, *H. urticoides*, entre outras. A distribuição geográfica do gênero *Hyptis* Jacq., encontra-se evidenciada na Figura 2.

Figura 2. Mapa de distribuição do gênero *Hyptis* Jacq. no mundo

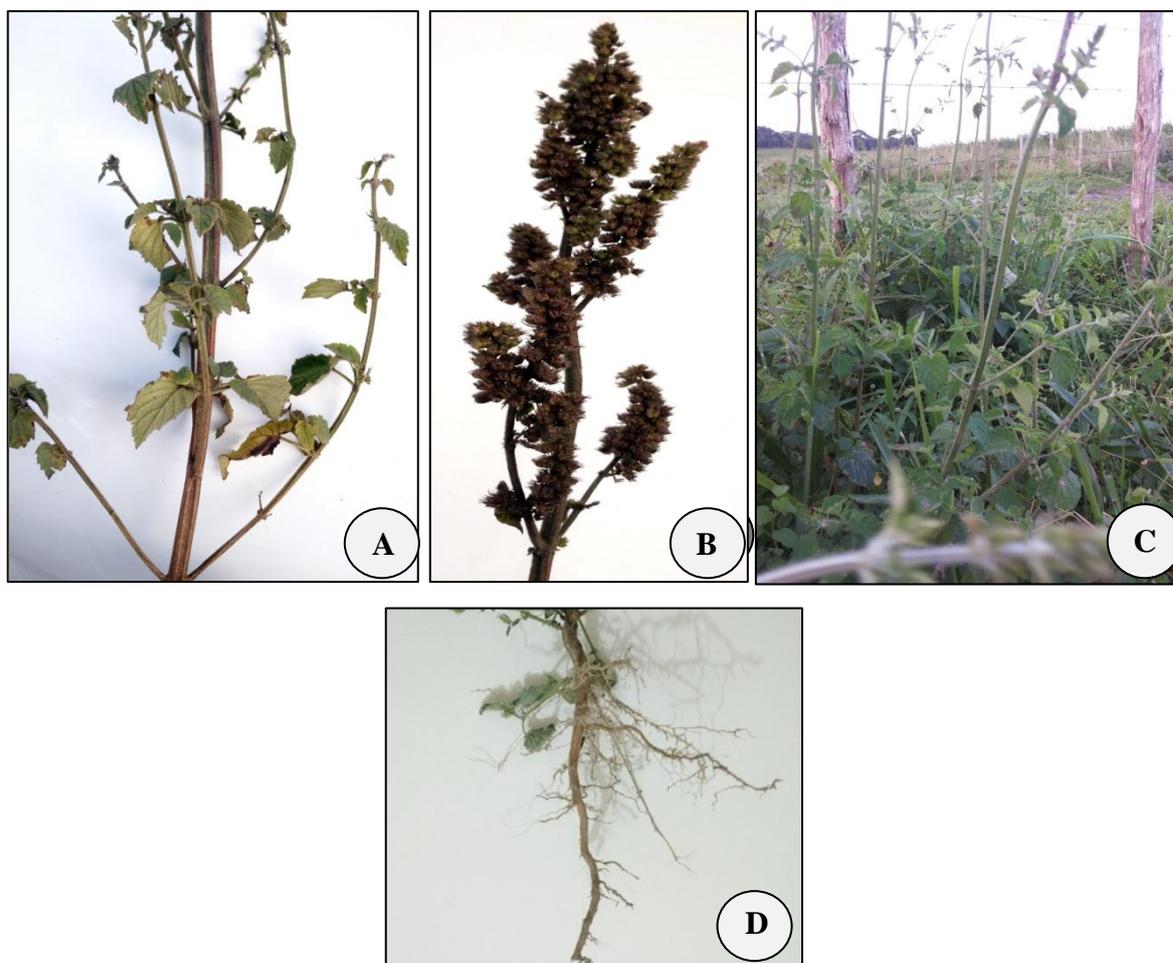


Fonte: <<http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=40030193&tab=maps>>; acesso em: 24 de março de 2015

Hyptis pectinata (L.) Poit (Figura 3), que possui alguns sinônimos como *Brotera persica*, *Hyptis racemosa*, *Bystropogon coarctatus*, *Hyptis nepetoides*, *Hyptis persica* e *Nepeta pectinata*, é uma planta nativa, não endêmica e apresenta uma distribuição pantropical, ocorrendo na América, desde os EUA, nos estados do Hawaii e Califórnia, até a região sul do Brasil, bem como na África, tanto em países ao oeste do continente, como Costa do Marfim, quanto em países mais ao centro do continente como Camarões e Tanzânia. Na Ásia está presente, sobretudo na Índia. Na Oceania está presente no norte da Austrália, Nova Zelândia e em várias outras ilhas banhadas pelo Pacífico, como as Ilhas Fiji (PIETSCHMANN et al., 1998; TCHOUMBOUGNANG et al., 2005; LIRA, 2006).

Seu uso da medicina popular está relacionado a várias condições patológicas, tais como: infecções de pele, faringite, congestão nasal, infecções bacterianas e fúngicas, distúrbios gástricos e congestão pulmonar (PEREIRA, 2014; RAYMUNDO et al., 2011).

Figura 3 – *Hyptis pectinata* em seu hábitat e seus diferentes órgãos: folhas, caule e flores.



A: Caule cinza-esverdeado e folhas; B: Detalhes das flores; C: *Hyptis pectinata* em seu hábitat; D: Raiz de *Hyptis pectinata*; Barras: A – 10 cm; B – 6 cm; D: 8 cm.

No Nordeste do Brasil, estas espécies são popularmente usadas na forma de infuso, decocto e cigarro, sendo indicadas no tratamento de várias doenças, especialmente das vias respiratórias (BASÍLIO, 2006), e comercializadas nas feiras livres. A Tabela 1 lista os diversos usos etnofarmacológicos de acordo com o local onde a espécie é cultivada.

Tabela 1. Distribuição geográfica, nome popular e etnofarmacologia das folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit

LOCAL	NOME POPULAR	USO POPULAR	REFERÊNCIAS
ÁFRICA			
CAMARÕES		Usada como planta medicinal por suas propriedades antibacteriana, antimicótica e antitussígena.	(TCHOUMBOUGNANG et al., 2005)
CABO VERDE	Rosmaninho	Aliviar sintomas associados a acidentes vasculares cerebrais (AVC), descongestionante nasal, rino-faringites, distúrbios gástricos e febre.	(LIMA, 2013)
COSTA DO MARFIM		Rino-faringites, congestão nasal e doenças de pele.	(MALAN, 1988)
TANZÂNIA	Hozangoghoe	Usada contra tosse e como cataplasma em furúnculos.	(BLANK et al., 2010; BOALINO et al., 2003)
GANÁ	Peaba	Propriedades antipiréticas.	BOALINO et al., 2003)
QUÊNIA	Mungaimu	Queimaduras.	(KISANGAU; HERRMANN, 2007)
AMÉRICA			
BRASIL	Sambacaitá, Sambacaité, canudinho, Alfazema de cabloco, Alfazema-do-mato, Macaé, mercúrio-do-campo, poejo-do-brejo	Utilizada para diferentes enfermidades, tais como rino-faringites, desordens gástricas, cicatrização, “banhar ferida e para mulher parida”, Câncer.	(BLANK et al., 2010; BOALINO et al., 2003; FALCÃO; MENEZES, 2003; LIRA, 2006; SILVA et al., 2006)
GUIANA FRANCESA	Woman-piaba	Tratamento da malária	(LIRA, 2006; VIGNERON et al., 2005)
MÉXICO	Hierba del burro, Xoltexnuk	Propriedades anti-infecciosas; Usado em febres, doenças de pele, distúrbios gástricos, rino-faringite e congestão pulmonar.	(FRAGOSO-SERRANO; GIBBONS; PEREDA-MIRANDA, 2005; PEREDA-MIRANDA et al., 1993; ROJAS et al., 1992)
ANTILHAS E BAHAMAS		Dores estomacais	(BOALINO et al., 2003)

2.1.1 Aspectos Botânicos

Hyptis pectinata é uma erva ou subarbusto, ereto, com 1-2 m de altura, ramificado, piloso; caule e ramos quadrangulares, cinza-esverdeados. As folhas são opostas, ovais ou oval-elípticas, ápice agudo, base obtusa ou obtuso-truncada, margem serrada ou crenada. Inflorescências terminais com 60-100-flores; ráquis longa, 20-50 cm de comprimento. As flores são curto-pediceladas, protegidas por brácteas, filiformes. Cálice tubuloso, inflado, glabrescente; 5 lacínios, subiguais. Corola alva a rósea, bilabiada, lábio superior 4-laciniado, lábio inferior cimbiforme; tubo estreito > 1 mm, 1-2 mm comprimento; 4 estames, anteras bitecas, transversais. Os frutos são esquizocárpicos, separando-se em quatro núculas, estreitas, oblongo-ovóides, finamente rugulosas, mucilaginosas (BASÍLIO et al., 2006).

2.1.2 Aspectos Químicos

As substâncias químicas encontradas seguem o padrão da família Lamiaceae, ou seja, predominância de metabólitos da via do acetato-mevalonato, mas com algumas substâncias de origem biossintética mista e da via do ácido chiquímico. Com relação a esses metabólitos encontrados em *H. pectinata*, existe uma grande diversidade, que inclui: monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos e compostos fenólicos (LIRA, 2006). Há ainda, diversos estudos que tratam da caracterização química do óleo essencial (OE) (LIRA, 2006; SILVA, 2006; ARRIGONI-BLANK et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2008; BLANK et al., 2010; LIMA, 2013).

2.1.3 Óleo essencial

Para a obtenção do óleo essencial de *Hyptis pectinata*, o método extrativo mais utilizado é a hidrodestilação em aparelho de clewenger e as partes mais utilizadas são as folhas. Para a caracterização do OE, é utilizada a Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM) e os compostos identificados são os Monoterpenos e os Sesquiterpenos, componentes dos óleos voláteis. (ARRIGONI-BLANK et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2008; SANTOS et al., 2008; RAYMUNDO et al., 2011; PEREIRA, 2014)

Os monoterpenos mais encontrados no óleo volátil de *H. pectinata* são mirceno; timol; α -pineno; α -tujeno; γ -terpineno; p-cimeno. Em relação aos sesquiterpenos, os quais são

predominantes no óleo essencial da espécie, vários estudos evidenciaram a presença em maior quantidade de β -cariofileno e óxido de cariofileno (SILVA, 2006; NASCIMENTO et al., 2008; SANTOS et al., 2008; RAYMUNDO et al., 2011; PEREIRA, 2014) e a existência de outros sesquiterpenos, tais como: germacreno-D; biciclogermacreno; β -elemeno, α -copaeno, α -humuleno, espatulenol e β -pineno e calamusenona (SILVA, 2006; BLANK et al., 2010; PEREIRA, 2014).

2.1.4 Flavonoides e Fenilpropanoides

Falcão et al. (2013) isolaram quatro flavonoides a partir do extrato etanólico das folhas de *Hyptis pectinata*, submetidos ao fracionamento em acetato de etila em coluna Sephadex. Os compostos obtidos foram o cirsiolol, a circimaritina, a 7-O-metil-luteolina e a genkvanina. O mesmo estudo isolou oito fenilpropanoides, sendo dois deles, novos compostos, nomeados: ácido sambacaitárico e ácido 3-O-metil-sambacaitárico. Os outros seis compostos foram o já conhecido ácido rosmarínico, ácido 3-O-metil-Rosmarínico, etil-cafeato, nepetoidina A e nepetoidina B (FALCAO et al., 2013).

2.1.5 Outros componentes

Foram encontradas lactonas: hiptolídeos, pectinolídeos A, B, C (PEREDA-MIRANDA, 1993), pectinolídeos D, E, F e G (BOALINO et al., 2003), pectinolídeo H (FRAGOSO-SERRANO; GIBBONS; PEREDA-MIRANDA, 2005). Ainda foi encontrado um triterpenoide, o ácido ursólico (PEREDA-MIRANDA et al., 1993).

2.2 Aspectos Farmacológicos

2.2.1 Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória

A administração do extrato aquoso de *H. pectinata* em ratos demonstrou efeitos antinociceptivo e antiedematogênico, com baixa toxicidade, indicada pela administração de doses de 5 g/kg, sem efeito letal (BISPO et al., 2001; SILVA, 2012).

O uso do extrato aquoso de *H. pectinata*, de diferentes origens, interferiu na ação de vários mediadores químicos de inflamação, como histamina, prostaglandinas e cininas, nas dosagens de 200, 400 e 600 mg/kg, quando utilizados por via oral em ratos. Diante disso, ficou evidenciado que *Hyptis pectinata* possui substâncias anti-inflamatórias em sua composição (ARRIGONI-BLANK et al., 2005).

Lisboa et al. (2006) avaliaram a atividade antinociceptiva dos extratos hexânico, clorofórmico e acetato de etila das folhas de *Hyptis pectinata*, a 100, 200 e 400 mg/kg e administrados por via oral em ratos Swiss. Os extratos reduziram significativamente o número de contrações induzidas por ácido acético a 0,6% e aumentaram as respostas aos estímulos térmicos do teste da placa quente, comprovando a atividade supracitada.

A atividade antinociceptiva do óleo essencial de *Hyptis pectinata* foi avaliada por Arrigoni-Blank et al. (2008) e Raymundo et al. (2011). O primeiro utilizou seis genótipos da mesma espécie em doses de 100, 200 e 400 mg/kg e o segundo fez uso de 10, 30 e 100 mg/kg. Ambos estudos fizeram uso de dois modelos de analgesia (contorções induzidas por ácido acético e placa quente). Raymundo e colaboradores testaram o potencial anti-inflamatório do óleo essencial através do teste da formalina e da bolsa de ar subcutânea. Os resultados indicaram que o óleo essencial de *H. pectinata* apresentou efeitos antinociceptivos, provavelmente mediados por receptores opióides e colinérgicos, e atividade anti-inflamatória através da inibição do óxido nítrico e da produção de PGE₂, em doses de 30 e 100 mg/kg. (ARRIGONI-BLANK et al., 2008; RAYMUNDO et al., 2011)

2.2.2 Atividade antibacteriana

A ação bactericida das flores de *Hyptis pectinata* foi observada por Adewunmi et al. (1980) e por Kloos et al. (1980) contra vários microorganismos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus* sp. (BASÍLIO et al., 2006).

Rojas (1992), Pereda-Miranda e Hernandez (1993) e Fragoso-Serrano (2005), em três estudos realizados no México, também demonstraram a atividade antibacteriana *in vitro* de *Hyptis pectinata*. O primeiro dos estudos avaliou a atividade do extrato metanólico frente bactérias Gram-positivas e Gram-negativas; nos estudos posteriores, foram utilizados quatro

pectinolídeos isolados de extrato clorofórmico, um deles apresentou resultados significativos frente cepas ATCC (American Type Culture Collection) de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, nas concentrações 6.25-12.5 $\mu\text{g/ml}$. O pectinolídeo H, utilizado nos ensaios de Fragoso-Serrano (2005), apresentou atividade frente duas cepas multirresistentes de *S. aureus*, nas concentrações de 32-64 $\mu\text{g/ml}$.

A Concentração Mínima Inibitória (CMI) do óleo essencial de *Hyptis pectinata* foi avaliada frente cepas ATCC Gram-positivas e Gram-Negativas. Os resultados foram mais significativos frente aos microorganismos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*), apresentado valores entre 12,5 e 50 $\mu\text{g/ml}$. As bactérias Gram-negativas apresentaram valores de CMI entre 200 e 300 $\mu\text{g/ml}$, os quais foram considerados potencialmente tóxicos naquelas concentrações (SANTOS et al., 2008).

A atividade anti-*Streptococcus mutans* do óleo essencial de *Hyptis pectinata* foi avaliado frente nove isolados clínicos e duas cepas ATCC. Os resultados obtidos demonstraram eficiência do óleo essencial emulsificado em Tween 80, que apresentou CMI de 200 $\mu\text{g/ml}$ e demonstrou ser uma promissora alternativa à clorexidina como agente antisséptico e de controle de doenças orais causadas por bactérias (NASCIMENTO et al., 2008).

2.2.3 Atividade antifúngica

O óleo essencial de *Hyptis pectinata* teve sua atividade antifúngica avaliada frente cepas padrões de *Candida albicans*, *Candida guilhermondii*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*. A CMI foi verificada e apresentou menores valores para *C. albicans* (0,58 $\mu\text{g/ml}$), *C. neoformans* (1,17 $\mu\text{g/ml}$) e *C. dubliniensis* (3,12 $\mu\text{g/ml}$), justificando a sensibilidade das cepas ao metabólito utilizado (SANTOS et al., 2008).

2.2.4 Atividade antiparasitária

Falcão et al. (2013) testaram a atividade *in vitro* de fenilpropanoides obtidos a partir do extrato etanólico de *Hyptis pectinata* frente formas promastigotas de *Leishmania brasiliensis*. O extrato etanólico e as frações hexânica, acetato de etila e metanol:água e três compostos, o ácido

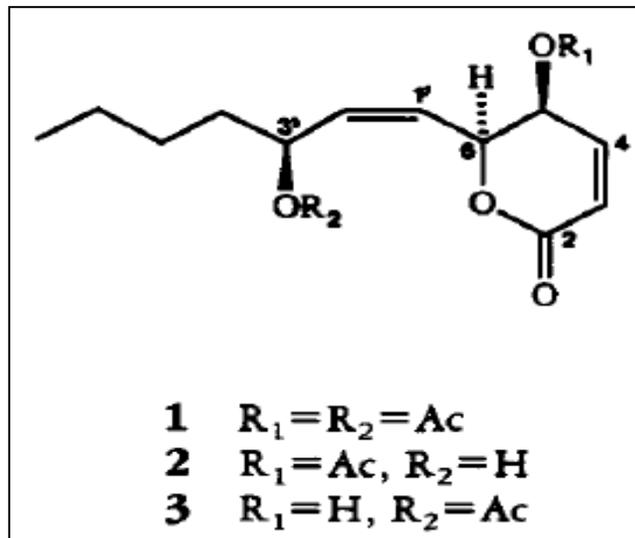
3-O-metil-rosmarínico, o ácido 3-O-metil-sambacaitárico e o ácido sambacaitárico (que demonstrou potência semelhante à pentamidina) apresentaram atividade leishmanicida.

Ainda com relação à atividade antileishmania, Queiroz et al. (2014) determinaram o potencial de inibição de *Leishmania amazonensis*, utilizando o extrato aquoso de *Hyptis pectinata*. Para as formas amastigotas, houve uma inibição de 55,3 % a uma concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que para as formas promastigotas a inibição foi de 81.9 $\mu\text{g/mL}$ a 100 $\mu\text{g/mL}$.

2.2.5 Atividade citotóxica

Pereda-Miranda et al (1993). avaliaram a atividade citotóxica dos pectinolídeos A(1), B(2) e C(3) (Figura 3), utilizando várias linhagens de células tumorais, tais como: câncer de mama, fibrosarcoma, câncer de pulmão, melanoma, cólon, carcinoma nasofaríngeo e leucemia linfocítica murínica. Dos três pectinolídeos, o pectinolídeo A apresentou melhores resultados frente às linhagens estudadas.

Figura 4. Pectinolídeos A(1), B(2) e C(3) (PEREDA-MIRANDA et al., 1993).



Em um estudo realizado por Barbosa e colaboradores (2012), o extrato hidroalcoólico de *Hyptis pectinata* teve sua atividade citotóxica evidenciada *in vitro* (frente três linhagens tumorais) e *in vivo* utilizando sarcoma 180 em camundongos. Os ensaios preliminares *in vitro* demonstraram moderada citotoxicidade: 62% de inibição frente à linhagem celular HCT-8

(adenocarcinoma), enquanto os testes *in vivo* apresentaram valores de inibição de 70,5% para sarcoma 180.

2.2.6 Atividade inseticida

Silva e colaboradores (2006) submeteram o óleo essencial de *Hyptis pectinata* ao teste da atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. A partir dos resultados, pode-se concluir que a atividade do óleo essencial de *H pectinata* foi moderada, apresentando uma CL₅₀ de 366,35 mg/L e que, provavelmente, não esteve relacionada ao componente majoritário encontrado no óleo, o β-cariofileno. O mesmo autor, em um estudo realizado em 2008, associou a atividade larvicida do óleo essencial de *Hyptis pectinata* ao óxido de cariofileno, que apresentou CL₅₀ 125 ± 2.05 ppm (SILVA et al., 2008)

2.2.7 Atividade moluscicida

Hyptis pectinata apresentou atividade moluscicida contra *Biomphalaria pfeifferi* e *Bulinos glabiosus* (BASÍLIO et al., 2006). Em um estudo realizado por Santos e colaboradores (2012), no estado de Alagoas, o extrato hidroalcoólico (90%) de *Hyptis pectinata* foi testado frente ao molusco *Biomphalaria glabrata*, vetor do parasita causador da Esquistossomose. A partir desses ensaios, foi possível comprovar o potencial de inibição através da CL₅₀ = 25.55 mg/L, evidenciando a atividade moluscicida do extrato utilizado.

2.2.8 Atividade no Sistema Nervoso Central

Bueno et al. (2006) buscaram identificar uma possível atividade do extrato aquoso das folhas da *Hyptis pectinata* sobre o sistema nervoso central de roedores da linhagem Wistar. Os resultados encontrados pelos pesquisadores sugeriram um possível efeito antidepressivo, o qual foi confirmado no modelo de hipotermia induzida pela apomorfina, onde o extrato aquoso antagonizou o efeito da apomorfina de maneira similar à imipramina, na dose de 200 mg/kg.

2.2.9 Outras atividades

Em ratos hepatectomizados, o extrato aquoso de *Hyptis pectinata* produziu regeneração na concentração de 100 mg/kg (SILVA et al., 2002). Já em ratos parcialmente hepatectomizados, o extrato aquoso de *H. pectinata* em associação à terapia a *laser* intraoperativa estimulou a regeneração hepática e provocou redução na função respiratória de mitocôndrias hepáticas sem alterar sua atividade fosforilativa (MELO et al., 2005a). Em outro estudo realizado pelo mesmo grupo, o uso de extrato aquoso liofilizado de *H. pectinata* na concentração de 100 mg/kg melhorou o índice de regeneração hepática, enquanto o de 200 mg/kg apresentou proteção hepática em ratos hepatectomizados (MELO et al., 2005b).

Paixão et al. (2015) buscaram evidenciar os mecanismos envolvidos no efeito do gel elaborado a partir do extrato aquoso de *Hyptis pectinata*, nas concentrações de 5% e 10%, comparando sua eficácia à da doxicilina. A análise dos resultados mostrou um aumento na prevenção da perda de massa corpórea e reabsorção óssea na doença periodontal experimental, com efeitos similares aos da doxiciclina a 10%, quando se utiliza o extrato aquoso de *H. pectinata*.

2.3 Toxicidade

Um estudo buscou avaliar a toxicidade aguda do extrato aquoso e do óleo essencial de *Hyptis pectinata* através da determinação da DL₅₀ de cada um deles em camundongos Swiss, pelo método dos probitos. O extrato aquoso não apresentou qualquer toxicidade, enquanto o óleo essencial teve uma DL₅₀ estimada em 1,1 g/Kg (LIRA, 2006).

2.4 Microrganismos de interesse clínico

As doenças infecciosas são as principais causas de mortes prematuras no mundo, sendo estimado 15 milhões de óbitos por ano. O crescimento da resistência bacteriana é um fator importante na ocorrência deste quantitativo de mortes, além de que, esta ameaça também dificulta a cura e eleva os gastos com a assistência a saúde (WHO, 2008).

As bactérias Gram-positivas, tais como as que pertencem ao gênero *Staphylococcus* sp. são importantes causadoras de infecções comunitárias e hospitalares e vários estudos as têm

associado às causas de mortalidade, sobressaindo-se que 53,92% das bacteremias são causadas por *Staphylococcus aureus* e coagulase negativos. Além desse gênero, *Micrococcus* sp. também pode estar associado à ocorrência de infecções como abscessos, pneumonia, artrite séptica, meningite, bacteremia e choque séptico em pacientes imunodeprimidos.

Cepas Gram-negativas apresentam-se associadas a casos de septicemia, infecções pós-cirúrgicas e do trato urinário. Um estudo realizado por Sousa et al. (2014) evidenciou a presença dessas bactérias em cerca de 48% das hemoculturas positivas de pacientes de uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de um hospital escola do estado de Goiás. Dentre as cepas relacionadas às infecções recorrentes por Gram-negativos, estão: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* sp. .

As leveduras do gênero *Candida* são responsáveis pela maioria das infecções fúngicas em ambientes hospitalares. Entre os pacientes hospitalizados, vários fatores têm sido reconhecidos como relacionados ao risco do desenvolvimento de candidíase: idade avançada, sexo feminino, antibioticoterapia de amplo espectro, o uso de corticosteroides e imunossupressores, presença de anormalidades anatômicas do trato urinário, diabetes, sondagem vesical de demora, pós-operatório de cirurgias de grande porte e doenças malignas (COLOMBO; GUIMARÃES, 2007).

2.4.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva, pertencente à família *Staphylococcaceae*, anaeróbia facultativa que apresenta cocos dispostos em “cachos de uva” de coloração amarelo-dourada. São positivos aos testes da coagulase, catalase, DNase e fermentadores do manitol, além de negativas ao teste da oxidase.

A espécie mais conhecida do gênero, *Staphylococcus aureus*, faz parte da microbiota natural da pele, narinas, axilas, períneo e intestino, podendo tornar-se patogênica em condições como a quebra da barreira cutânea ou diminuição da imunidade. É responsável por uma grande variedade de infecções, como infecções na pele e subcutâneas, infecções pós-cirúrgicas, osteomielites, pneumonias, abscessos, endocardites e septicemia. São umas das causas mais comuns de infecções hospitalares e comunitárias, apresentando-se como responsável por altos índices de morbi-mortalidade (GELATTI et al., 2009). A virulência destas bactérias está

associada à secreção de toxinas superantigênicas, as quais são capazes de causar Síndrome do Choque Tóxico (SCT) e maciça liberação de citocinas a partir dos macrófagos e células T (FEY et al., 2003).

Desde a década de 1960, *Staphylococcus aureus* tem trazido preocupação quanto à resistência contínua apresentada aos antibióticos, após a introdução da penicilina na terapêutica (EVANGELISTA; OLIVEIRA, 2015). Para contornar o problema, foi introduzida a Meticilina, a qual era resistente à ação das enzimas beta-lactamases, produzidas pelos *Staphylococcus aureus*. Relatos de resistência adquirida à Meticilina, nos Estados Unidos, associados à expressão da multirresistência, justificaram o uso da sigla MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), utilizada para identificar os microorganismos com tais características (GELATTI et al., 2009; LOWY, 1998). As cepas MRSA possuem o gene *MecA*, que codifica a síntese da proteína *PBP2a*, uma ligante de penicilina alterada, que, embora capaz de realizar o “cross link” entre as moléculas de peptidoglicano, tem afinidade de ligação extremamente baixa a muitos antibióticos betalactâmicos, justificando a resistência.

Atualmente, três estágios acontecem simultaneamente no mundo: Cepas MRSA com susceptibilidade reduzida aos glicopeptídeos vancomicina e teicoplanina, designadas *S. aureus* com Resistência Intermediária à Vancomicina (VISA) ou cepas resistentes à vancomicina, conhecidas como *S. aureus* Resistentes à Vancomicina (VRSA) (CDC, 2002); Prevalência de clones de MRSA multirresistentes considerados endêmicos em hospitais de diversas localidades no mundo; e a emergência de cepas não-multirresistentes de MRSA, isoladas principalmente de infecções comunitárias (OKUMA et al., 2002; SILVA, 2005).

2.4.2 *Staphylococcus coagulase negativo* (SCN)

Staphylococcus coagulase negativos representam o maior componente da microbiota cutânea e por viverem em equilíbrio com os ecossistemas onde estão inseridos, foram tratados durante muito tempo como microrganismos avirulentos. Atualmente, porém, estes microrganismos podem se apresentar como bactérias oportunistas emergentes, especialmente em pacientes hospitalizados, imunocomprometidos, prematuros e com dispositivos implantados.

As principais espécies de SCN envolvidas em infecções são: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus*

warneri, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus lugdunensis* e *Staphylococcus xylosus*, embora outras espécies possam também causar infecções em humanos (KLOOS & BANNERMAN, 1994; CUNHA et al., 2002; CHANG et al., 2003; ROSS et al., 2005; SINGHAL et al., 2006). Entre elas, *S. epidermidis* é o agente mais associado com as infecções, especialmente com as bacteremias, inclusive no Brasil (KLOOS & BANNERMAN, 1994; CUNHA et al., 2002; CHANG et al., 2003; TEIXEIRA, 2009).

Staphylococcus coagulase negativos são produtores de *slime* ou biofilme, fator de virulência que permite estas bactérias aderir às superfícies lisas de biomateriais, sendo por isso, associadas aos processos de infecção por meio dos procedimentos invasivos. Através disso, estudos têm demonstrado que cepas de SCN têm apresentado alta resistência à Oxacilina (BERNARDI; PIZZOLITTO; PIZZOLITTO, 2007; CORDEIRO, 2007; GROSSA, 2015) e avaliada a produção do gene *MecA*, até mesmo em cepas isoladas da saliva de profissionais da Enfermagem (MELO, 2003). Igualmente, estes microorganismos são apontados como os principais agentes de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) em neonatos internados em UTIN (Unidades de Terapia Intensiva Neonatal) (SILVA et al., 2013).

2.4.3 *Pseudomonas aeruginosa*

As bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* são bacilos Gram-negativos, aeróbios e não fermentadores de glicose. Dentre as principais espécies patogênicas deste gênero, estão incluídas *P.aeruginosa*, *P.fluorescens*, *P.putida*, *P.cepacia*, *P.stutzeri*, *P.maltophilia* e *P.putrefaciens*. Dentre estas espécies, *Pseudomonas aeruginosa* é a que possui maior importância clínica, pois além de estar relacionada com consideráveis taxas de morbi-morbidade, prolongada hospitalização e aumento dos custos com tratamentos nas unidades hospitalares (MICEK et al., 2015), ainda tem apresentado amplo espectro de resistência a várias classes de antimicrobianos (FIGUEIREDO et al., 2007; LAGATOLLA et al., 2004).

Pseudomonas aeruginosa apresenta notável habilidade em adquirir mecanismos de resistência, sendo os genes que codificam essas enzimas geralmente adquiridos através de mecanismos de transferência genética intra e/ou interespecies. Diante disso, diversos estudos têm sido desenvolvidos para determinar a frequência genotípica de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e evidenciado resultados preocupantes da presença de novos genes em locais

onde não existia, o que contribui de forma expressiva para a disseminação da resistência por isolados destas bactérias (KOBA et al., 2007).

2.4.4 *Enterobacteriaceae*

A família Enterobacteriaceae compreende mais de 30 gêneros e 130 espécies. Os gêneros mais frequentemente isolados de amostras biológicas são *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia*, *Providencia* e *Yersinia*. Estes microrganismos são Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, móveis ou imóveis e não formadores de esporos. Geralmente apresentam positividade para a prova da catalase, porém, são negativos para a oxidase. As bactérias pertencentes a esse gênero são os maiores componentes da microbiota intestinal humana, mas são relativamente incomuns em outros sítios do corpo (OLIVEIRA, 2008).

Um importante mecanismo de resistência desenvolvido pelas bactérias dessa família foi a produção de ESBL (Beta-lactamases de espectro ampliado). O tratamento de infecções causadas por cepas produtoras de ESBL oferece um substancial desafio à terapia antimicrobiana, pois tais enzimas são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de todas as gerações e monobactâmicos, reduzindo as alternativas terapêuticas. Os principais gêneros produtores das ESBL, dentre as enterobactérias, são *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* sp, *Providencia* sp. e *Enterobacter* sp. . Enterobactérias produtoras das enzimas estão amplamente disseminadas, já tendo sido reportadas na França, Estados Unidos, Reino Unido, Grécia, Holanda, Hungria, Portugal, Bolívia, Peru, Brasil, entre outros (LAGO; FUENTEFRIA; FUENTEFRIA, 2010).

Além disso, entre 2001 e 2003 foram descritas pela primeira vez novas enzimas que hidrolisam os carbapenêmicos, isoladas inicialmente em *Klebsiella pneumoniae*, e por isso denominadas *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) (MOLAND et al., 2003; YIGIT et al., 2001). Bactérias produtoras de KPC tiveram rápida expansão nos Estados Unidos, países europeus e América do Sul, incluindo o Brasil. Estudo realizado no estado do Rio Grande do Sul evidenciou altas mortalidades em pacientes infectados por KPC, o que tem tornado preocupantes os quadros destas infecções. Além disso, verificou-se que o mecanismo de resistência da KPC foi

implicado em surtos causados por outros membros da família das enterobactérias (BORGES et al., 2015).

2.4.5 *Candida* spp.

Espécies de *Candida* são os fungos leveduriformes mais usualmente envolvidas na etiologia de infecções micóticas. A candidíase caracteriza-se como a infecção fúngica mais comum, sendo *C. albicans* seu agente etiológico mais frequente. Os quadros clínicos mais rotineiros são relacionados à candidíase do tipo cutâneo-mucosa, sistêmica/visceral e alérgica (DE OLIVEIRA LIMA et al., 2006).

As infecções fúngicas de origem hospitalar passaram a apresentar grande importância nos últimos anos, pelo seu aumento progressivo e por suas elevadas taxas de morbidade e mortalidade (FIDEL; VAZQUEZ; SOBEL, 1999). Além disso, a resistência aos agentes antifúngicos entre as espécies de *Candida* spp. tem sido um problema crescente, tornando-se necessária a realização de testes de suscetibilidade nos isolados clínicos (ALTHAUS et al., 2015)

Os pacientes imunocomprometidos possuem uma maior probabilidade de serem acometidos por infecções fúngicas, como os indivíduos portadores de leucemia, linfoma, diabetes mellitus e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), sendo, a identificação prévia da espécie de *Candida* e a determinação da suscetibilidade *in vitro*, recomendadas em alguns casos, como na candidíase de orofaringe de pacientes infectados com HIV, micoses sistêmicas e vaginites recorrentes (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; ALTHAUS et al.; 2015).

Nesta perspectiva, os produtos naturais e sintéticos têm se mostrado uma alternativa bastante eficaz para o tratamento destas infecções.

2.5 Câncer

A palavra câncer (do grego *karkínos*, que quer dizer caranguejo) foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates, o pai da medicina, que viveu entre 460 e 377 a.C. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo (INCA, 2015).

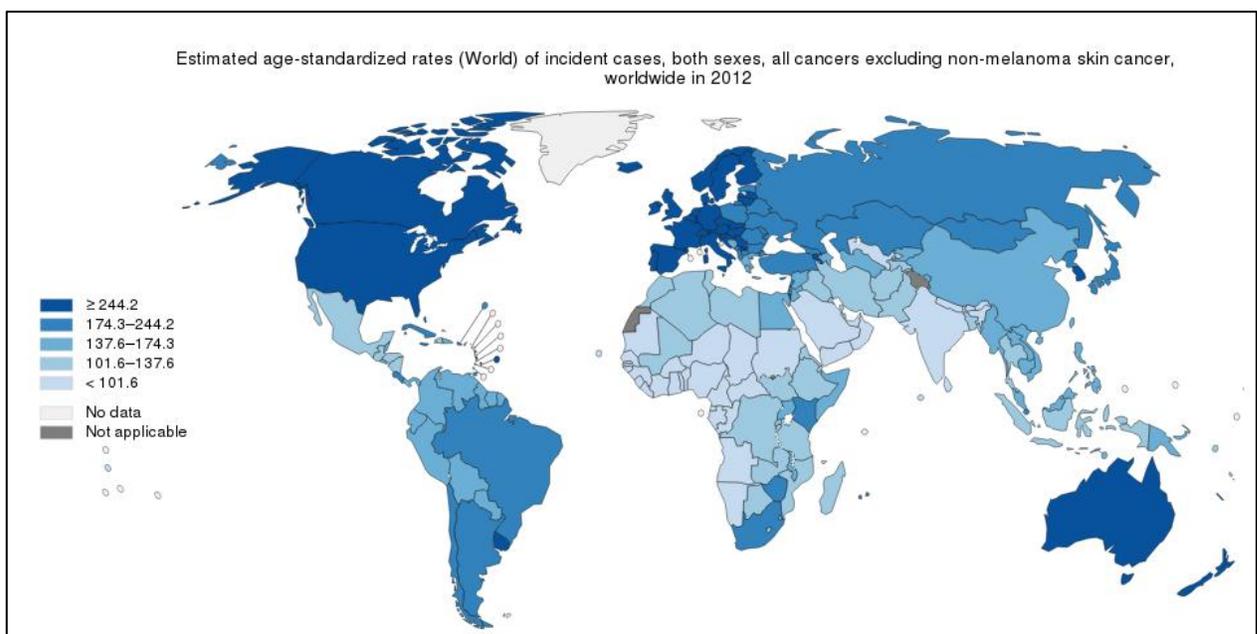
Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida (INCA, 2015).

Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Um exemplo é o câncer de pele, já que a mesma é formada de mais de um tipo de célula. Outras características que diferenciam os diversos tipos de câncer entre si são a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes (INCA, 2015).

2.5.1 Epidemiologia do Câncer

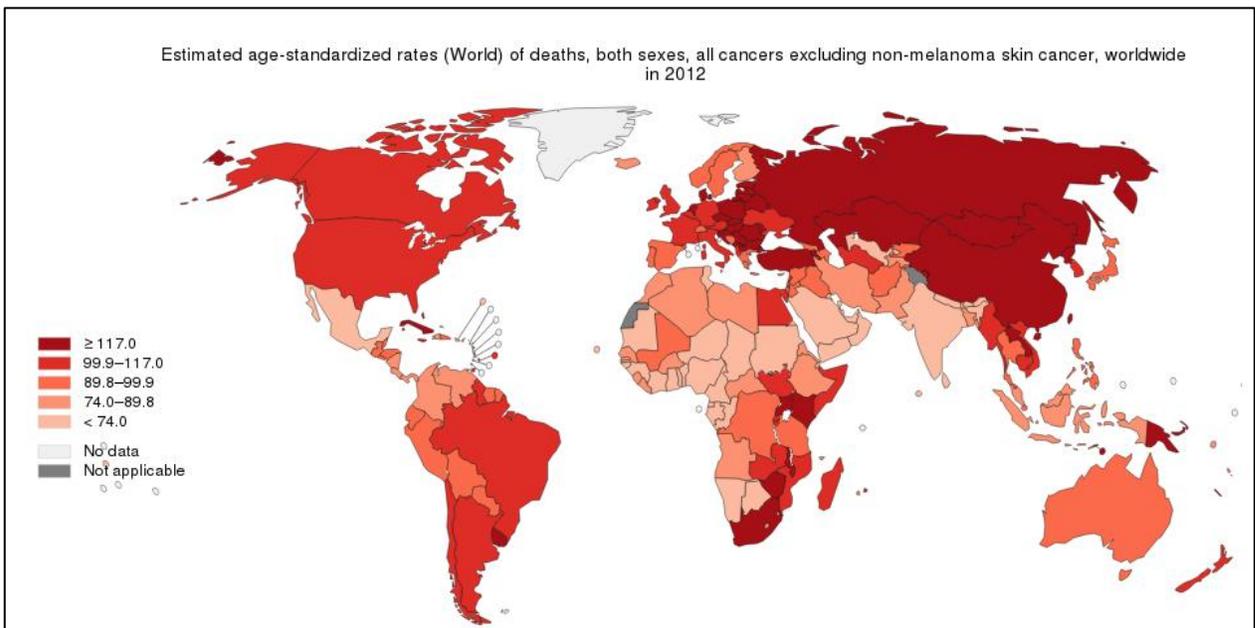
Com base no documento World Cancer Report 2014 da International Agency for Research on Cancer (IARC), da Organização Mundial da Saúde (OMS), torna-se indiscutível que o câncer é um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento, onde é esperado que, nas próximas décadas, o impacto do câncer na população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025 (INCA, 2015). A figura 4 mostra a incidência do câncer no ano de 2012, segundo levantamento do GLOBOCAN.

Figura 5. Incidência de Câncer no mundo em 2012 (GLOBOCAN, 2012).



A estimativa mundial, realizada em 2012, pelo projeto GLOBOCAN/IARC, apontou que, dos 14 milhões de casos novos estimados, mais de 60% ocorreram em países em desenvolvimento. Para a mortalidade, a situação agravou-se quando se constatou que, dos 8 milhões de óbitos previstos, 70% ocorreram nesses mesmos países. Em 2008, foram aproximadamente 12,7 milhões de novos casos e 7,6 milhões de óbitos. As estimativas de prevalência para 2012 mostravam que existiam 32,6 milhões de pessoas (com idade superior a 15 anos) que tiveram um câncer diagnosticado nos últimos cinco anos. A figura 5 demonstra a mortalidade que o Câncer representou no ano de 2012.

Figura 6. Mortalidade por Câncer em ambos os sexos, em 2012 (GLOBOCAN, 2012).



Os tipos de câncer mais incidentes no mundo foram pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão). Nos homens, os mais frequentes foram pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Em mulheres, as maiores frequências encontradas foram mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%).

Ainda com base nas informações do projeto Globocan, na região da América Latina e do Caribe, estimou-se, para 2012, a ocorrência de 1,1 milhão de casos novos de câncer, sendo os tipos de câncer mais incidentes os de próstata (152 mil) em homens e mama (152 mil) em mulheres. Entretanto, o câncer do colo do útero ainda contribui de forma importante para a carga

da doença em mulheres, figurando como o segundo mais incidente e como a segunda causa de morte por câncer em mulheres. Dos cerca de 530 mil casos novos de câncer estimados para os homens, o câncer de próstata foi o mais frequente (28,6%), seguido pelos cânceres de pulmão (9,8%), intestino (8,0%), estômago (6,8%) e bexiga (3,3%). Para as mulheres, os 560 mil casos novos, aproximadamente, foram assim distribuídos: mama (27%), colo do útero (12,2%), intestino (7,9%), pulmão (5,7%) e estômago (4,3%).

Para o biênio 2016-2017, estima-se a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil casos novos), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos de câncer. O perfil epidemiológico observado assemelha-se ao da América Latina e do Caribe, onde os cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres serão os mais frequentes. As estimativas para o ano de 2016 podem ser visualizadas na figura 6, que segmenta por tipo de neoplasia e por sexo o número esperado de novos casos de câncer no Brasil.

Figura 7. Estimativas para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	61.200	61,82	13.940	64,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.960	56,20	18.990	79,37
Colo do Útero	-	-	-	-	16.340	15,85	4.550	19,07
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	17,49	4.430	20,59	10.890	10,54	3.230	13,49
Cólon e Reto	16.660	16,84	5.560	25,80	17.620	17,10	6.210	25,95
Estômago	12.920	13,04	3.130	14,54	7.600	7,37	2.180	9,07
Cavidade Oral	11.140	11,27	2.780	12,95	4.350	4,21	1.230	5,04
Laringe	6.360	6,43	1.600	7,50	990	0,94	320	0,97
Bexiga	7.200	7,26	2.110	9,79	2.470	2,39	830	3,21
Esôfago	7.950	8,04	1.460	6,75	2.860	2,76	610	2,27
Ovário	-	-	-	-	6.150	5,95	2.170	8,92
Linfoma de Hodgkin	1.460	1,46	450	1,74	1.010	0,93	400	1,33
Linfoma não Hodgkin	5.210	5,27	1.550	7,15	5.030	4,88	1.670	7,02
Glândula Tireoide	1.090	1,08	350	1,27	5.870	5,70	1.800	7,46
Sistema Nervoso Central	5.440	5,50	1.290	5,86	4.830	4,68	1.250	5,20
Leucemias	5.540	5,63	1.370	6,38	4.530	4,38	1.180	4,88
Corpo do Útero	-	-	-	-	6.950	6,74	2.530	10,47
Pele Melanoma	3.000	3,03	840	3,86	2.670	2,59	740	2,96
Outras Localizações	51.850	52,38	11.890	55,45	47.840	46,36	11.820	49,33
Subtotal	214.350	216,48	52.750	245,63	205.960	199,57	61.710	257,55
Pele não Melanoma	80.850	81,66	17.370	80,90	94.910	91,98	21.910	91,65
Todas as Neoplasias	295.200	298,13	70.120	326,51	300.870	291,54	83.620	348,99

*Números arredondados para múltiplos de 10.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial Citotóxico, Anti-inflamatório e Antimicrobiano de extratos de *Hyptis pectinata* (L.) Poit.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter os extratos das folhas de *Hyptis pectinata* em diferentes solventes de polaridades distintas e crescentes;
- Realizar a triagem fitoquímica dos extratos obtidos;
- Obter e caracterizar por CG-EM o óleo essencial das folhas de *Hyptis pectinata*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos, frente isolados clínicos e cepas ATCC Gram-positivas e Gram-negativas e fungos leveduriformes;
- Avaliar o potencial citotóxico *in vitro* dos extratos (frente três diferentes linhagens de células tumorais);
- Avaliar a possível atividade anti-inflamatória *in vitro* dos extratos das folhas de *Hyptis pectinata*.

METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

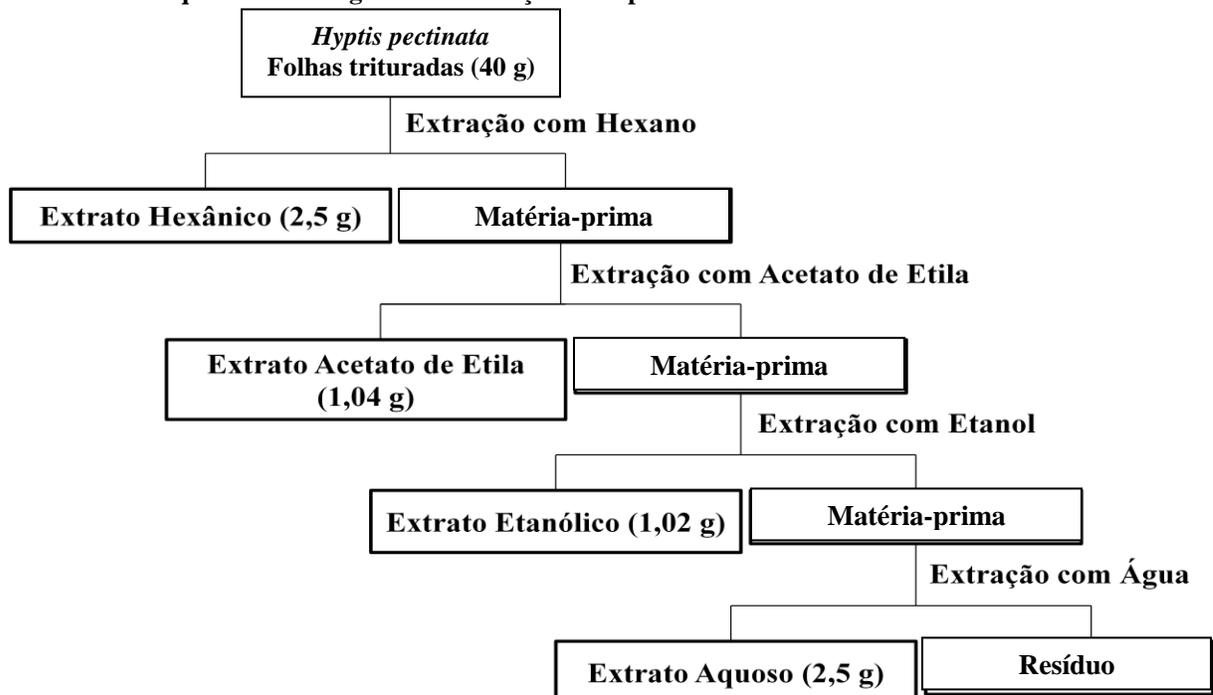
4.1 Coleta do material vegetal

A coleta das folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit foi realizada entre os meses de Março e Maio de 2014, no sítio Palmeira, município de Camocim de São Félix – PE (Latitude: 08°21'31"; Longitude: 35°45'43"; Altitude: 691 metros). A exsicata foi depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima, na Empresa Pernambucana de Pesquisas Agropecuárias (IPA), sob o número de registro 89175 e identificada pela curadora Olívia Cano.

4.2 Obtenção dos extratos

Após a coleta, as folhas foram submetidas à secagem à sombra, trituradas e pesadas. Após a pesagem, 40 g da planta foram extraídos em diferentes solventes de polaridades distintas e crescentes, em Soxhlet, com ciclos de seis horas. Os solventes utilizados em ordem crescente de polaridade foram hexano, acetato de etila, etanol e água, conforme demonstrado pelo Esquema 1, baseando-se na busca pela obtenção de extratos brutos. Após as extrações, os solventes foram evaporados com auxílio de um rotaevaporador e os extratos secos foram armazenados a 10°C.

Esquema 1. Fluxograma de extrações e respectivas massas de extrato seco obtidas.



4.3 Triagem Fitoquímica

O perfil fitoquímico foi evidenciado a partir de extratos brutos secos das folhas de *Hyptis pectinata*: hexânico, acetato de etila, etanólico e aquoso. Os extratos foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), empregando-se diversas fases móveis e reveladores adequados, de acordo com a metodologia descrita na Tabela 1.

Para identificar a presença de saponinas, realizou-se o teste de afrogenicidade (teste qualitativo de espuma). Para o teste, ferveu-se (decoção) 2 g da droga vegetal pulverizada com 10 mL de água destilada por três minutos. Agitou-se abundantemente a solução por 15 segundos e deixou-se a mesma em repouso, por quinze minutos. Em seguida, foi analisada qualitativamente a permanência da espuma (BRUNETON, 1991).

Tabela 2 – Sistemas cromatográficos, padrões e reveladores empregados na prospecção fitoquímica de *Hyptis pectinata* L. Poit

CLASSE DE METABÓLITO	SISTEMA DE ELUIÇÃO	PADRÃO	REVELADOR	REFERÊNCIA
Alcaloides	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O ¹	Pilocarpina	Dragendorff	(WAGNER; BLADT, 1996)
Mono e Sesquiterpenos	Tolueno-AcOEt ²	Timol	Vanilina Sulfúrica	(WAGNER; BLADT, 1996)
Triterpenos e Esteroides	Tolueno-AcOEt ³	β-sitosterol	Liebermann Buchard	(HARBORNE, 1998)
Cumarinas	n-Hexano-AcOEt ⁴	Umbeliferona	KOH 10% em EtOH	(WAGNER; BLADT, 1996)
Flavonoides Fenilpropanoglicosídeos Derivados Cinâmicos	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O ¹	Rutina	NEU + UV	(WAGNER; BLADT, 1996)
Taninos Condensados	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O ⁵	Epicatequina	Vanilina Clorídrica	(WAGNER; BLADT, 1996)
Taninos Hidrolisáveis	AcOEt-HCOOH- AcOH-H ₂ O ¹	Ácido gálico	NEU + UV	(WAGNER; BLADT, 1996)
Antraquinonas	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O ⁵	Aloína	KOH 10% em H ₂ O	(WAGNER; BLADT, 1996)

¹ 100:11:11:27 v/v; ² 97:3 v/v; ³ 90:10 v/v; ⁴ 95:5 v/v; ⁵ 100:3:3:3 v/v; ⁶ 97:3 v/v; AcOEt = Acetato de Etila; HCOOH = Ácido Acético; AcOH = Ácido Fórmico; H₂O = Água; CHCl₃ = Clorofórmio; MeOH = Metanol; UV = Ultravioleta; KOH = Hidróxido de Potássio.

4.4 Extração do Óleo Essencial (OE)

O Óleo Essencial de *Hyptis pectinata* foi extraído das folhas frescas pelo método de hidrodestilação em Clevenger. Partiu-se de 90 g de material vegetal, fez-se o uso de 500 mL de água destilada e realizou-se a extração por duas horas, a uma temperatura de 100 °C. Em seguida, o hidrolato (água + óleo) foi coletado e após o repouso e a separação em duas fases, retirou-se o OE.

4.4.1 Cálculo do rendimento do óleo essencial

O rendimento do Óleo Essencial de *Hyptis pectinata* foi calculado em triplicata utilizando-se 90 g das folhas frescas, após a mensuração do volume final de óleo obtido após a separação da água. De acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010), o rendimento foi expresso em gramas por mililitro (g/mL).

4.4.2 Caracterização do óleo essencial por CG-EM

A análise da amostra em cromatógrafo a gás acoplado a Espectrômetro de Massas foi realizada em equipamento Shimadzu tipo quádruplo modelo GCMS-QP2010s (Shimadzu, Japão) e equipado com coluna capilar de sílica RTX-5 (30 m x 0.25 mm x 1µm). As condições de injeção foram temperatura do injetor de 250°C, injetor do tipo splitless com pressão da coluna de 160 Kpa, fluxo total de 78,1 ml/min fluxo da coluna de 2,52 mL/min e velocidade linear de 58,2 cm/seg, fluxo de purga de 3.0ml/min razão de split de 30.0 e tempo de corrida da coluna de 50 min. A programação da temperatura foi de 50°C à 150°C/2,5°C/min, seguida de 150°C à 250°C/25°C/min. e logo 15 min. à 250°C. O espectro de massas foi programado para realizar leituras em uma faixa de 33 a 750 Da, com energia de ionização de 70 eV e temperatura de 260°C na câmara de íons, da interface e do detector. Foram diluídos 10 µL do óleo em 300 µL de acetona e 1 µL da amostra foi injetado no CG. A identificação dos componentes foi feita pela comparação de seus espectros de massas com o banco de dados disponível no Padetec/Universidade Federal do Ceará e também pelos Índices de Retenção de Kovats (IK).

4.5 Atividade antimicrobiana

4.5.1 Microrganismos

Neste estudo foram utilizadas dezesseis cepas bacterianas, sendo sete delas Gram-positivas e as restantes Gram-negativas. Das cepas Gram-positivas, três foram pertencentes à espécie *Staphylococcus aureus* (duas cepas padrão e um isolado clínico), três foram isolados clínicos de *Staphylococcus* coagulase negativos e um isolado clínico da espécie *Micrococcus luteus*, conforme a tabela 3.

Tabela 3 – Cepas Gram-positivas utilizadas nos ensaios e suas respectivas origens.

ESPÉCIE	CÓDIGO	ORIGEM
<i>Staphylococcus aureus</i>	AM 103	ATCC 6538
<i>Staphylococcus aureus</i>	AM 106	ATCC 6538P
<i>Staphylococcus aureus</i> MSSA	AM 1235	Secreção
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	AM 235	Esperma
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	AM 1162	Fragmento ósseo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AM 1198	Secreção
<i>Micrococcus luteus</i>	AM 1200	Líquido peritoneal

AM: Código da coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas – Depto. de Ciências Farmacêuticas – UFPE; ATCC: American Type Culture Collection; MSSA: *Staphylococcus aureus* Meticilina Sensível.

Dentre as bactérias Gram-negativas, foram estudados seis isolados clínicos únicos (dois de *Klebsiella pneumoniae*, um de *Salmonella* sp., dois de *Pseudomonas aeruginosa* e um de *Proteus mirabilis*) e três cepas padrão (ATCC) – duas de *Escherichia coli* e uma *Salmonella typhimurium* (Tabela 4).

Tabela 4 – Cepas Gram-negativas utilizadas nos ensaios e suas respectivas origens.

ESPÉCIE	CÓDIGO	ORIGEM
<i>Escherichia coli</i>	AM 251	ATCC 25922
<i>Escherichia coli</i>	AM 1281	ATCC 35218
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AM 342	Ponta de Cateter
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AM 411	Bile
<i>Salmonella</i> sp.	AM 1182	Fezes
<i>Salmonella typhimurium</i>	AM 1280	ATCC 14028
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AM 457	Urocultura
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AM 458	Urocultura
<i>Proteus mirabilis</i>	AM 1115	Urocultura

AM: Código da coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas – Depto. de Ciências Farmacêuticas – UFPE; ATCC: American Type Culture Collection

Para a determinação da atividade antifúngica dos extratos brutos secos utilizados, foram utilizadas três cepas leveduriformes, todos pertencentes à espécie *Candida albicans* (Tabela 5).

Tabela 5 – Fungos leveduriformes utilizados nos ensaios e suas respectivas origens.

ESPÉCIE	CÓDIGO	ORIGEM
<i>Candida albicans</i>	AM 1285	Mucosa esofágica
<i>Candida albicans</i>	AM 1287	Mucosa
<i>Candida albicans</i>	AM 1288	ATCC 14053

AM: Código da coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas – Depto. de Ciências Farmacêuticas – UFPE; **ATCC:** American Type Culture Collection.

4.5.2 Preparação dos inóculos

A partir de culturas recentes (24 h) bacterianas e leveduriformes foram feitas suspensões de 5 mL em solução fisiológica estéril, ajustando a turvação do tubo à escala 0,5 de McFarland, obtendo-se 10^8 e 10^6 UFC/mL (Unidades Formadores de Colônias por mililitro), respectivamente (CLSI, 2003; 2004).

4.5.3 Preparação dos padrões antimicrobianos e dos extratos

Para os ensaios realizados, todos os extratos foram solubilizados em solução aquosa de DMSO (Dimetilsulfóxido) a 20% (v/v). O extrato hexânico passou pelo processo de agitação. Os antimicrobianos padrões utilizados nos testes foram a Tetraciclina (300 µg/mL) e a Ceftriaxona (300 µg/mL), para as bactérias; e o Cetoconazol (100 µg/mL) para as leveduras. .

4.5.4 Técnica de poços / Difusão em Agar

Os ensaios de difusão são métodos quantitativos, nos quais o efeito pode ser graduado, fundamentam-se na difusão da substância a ser ensaiada, em um meio de cultura sólido com o microrganismo inoculado. Diante disso, os inóculos previamente preparados foram semeados em placa de Petri contendo 20 mL de Agar Mueller-Hinton (para bactérias) e Agar Sabouraud Dextrose (para fungos). Em seguida, foram realizadas as perfurações assépticas dos poços com auxílio de um perfurador (de 6 mm de diâmetro) e as aplicações das soluções dos extratos secos em DMSO a 20% em três diferentes concentrações (10 mg, 5 mg e 2,5 mg/poço), utilizando-se

pipeta automática na razão de 100 µL/poço. Os antimicrobianos-padrão foram: Tetraciclina (300 µg/mL), Ceftriaxona (300 µg/mL) e o Cetoconazol (100 µg/mL). Como controle negativo, foi utilizada a solução de DMSO a 20%.

Após a incubação a 37°C ± 1°C (bactérias) e 30°C ± 1°C (fungos) por 24 horas, a atividade antibacteriana foi avaliada pela medição dos halos de inibição (CLSI, 2003; 2004).

4.5.5 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) por microdiluição em caldo

Os extratos testados que apresentaram atividade antimicrobiana preliminar, pela técnica de poços/difusão em Agar, foram submetidos à determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) pela técnica de microdiluição em caldo. Os testes foram realizados em caldo Mueller Hinton contidos em placa de 96 poços, utilizada em análises de ELISA. Alíquotas de 20 µL de cada extrato nas concentrações de 1000, 500, 250, 125, 62,5; 31,25; 15,62 e 7,81 µg/mL foram depositadas em cada poço da placa contendo caldo Muller Hinton e 10 µL suspensão de microrganismos para um volume final de 100 µL em cada poço. Foram realizados controles dos extratos brutos, do caldo Mueller Hinton, das suspensões de microrganismos e do DMSO a 20% (utilizado para solubilizar os extratos). Os antimicrobianos utilizados foram a Tetraciclina, a Ceftriaxona e o Cetoconazol, todos em concentrações de 0,062 a 128 µg/mL. As placas foram cobertas e incubadas a 35°C por 24 horas. Passado o tempo de incubação, adicionaram-se 10 µL de Resazurina nos poços, a fim de se determinar qualitativamente o crescimento de acordo com a coloração apresentada. Os ensaios foram realizados em triplicata e considerou-se como CMI a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento microbiano. Os resultados foram expressos pelas médias das triplicatas realizadas.

4.5.6 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de *Hyptis pectinata*

A avaliação da atividade antimicrobiana de um extrato é determinada pela medida do diâmetro do halo de inibição deste frente aos microrganismos testados (LENETTE et al., 1987) e pela menor concentração capaz de inibir o crescimento de um determinado microrganismo, a Concentração Mínima Inibitória (CMI).

No que se referem ao potencial antimicrobiano, as medidas dos halos de inibição foram estabelecidas de acordo com os parâmetros preconizados por Alves e colaboradores (2000): < 9

mm, inativo; 9 - 12 mm, pouco ativo; 13 - 18 mm, ativo; e, > 18 mm, muito ativo. Quanto ao potencial antimicrobiano, pela medida da concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos vegetais, são considerados como muito ativos aqueles que apresentarem CMI < 100 µg/mL; ativos com CMI entre 100 - 500 µg/mL e moderadamente ativos com CMI de 500 - 1000 µg/mL, baixa atividade com CMI de 1000 - 2000 µg /mL e inativos com CMI > 2000 µg /mL. As Concentrações Mínimas Inibitórias foram calculadas apenas para os extratos que apresentaram boa atividade pela técnica de poços/difusão em Agar, ou seja, halos \geq 13 mm.

4.6 Ensaio da atividade citotóxica

A atividade citotóxica dos extratos hexânico, acetato de etila, etanólico e aquoso de *Hyptis pectinata*, foi avaliada frente às seguintes linhagens de células cancerígenas humanas: NCI-H-292 (carcinoma de pulmão) HL-60 (leucemia promielocítica) e HEP (carcinoma de laringe) fornecido pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (RJ-Brasil). Todas as células cancerígenas foram mantidas em meio RPMI 1640 e DMEN suplementado com 10% de soro fetal bovino, glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina a 37 °C com 5% de CO₂. A citotoxicidade de todos os extratos foi testada utilizando o ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazólio (MTT) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA).

Em todos os ensaios realizados, as células tumorais foram incubadas em placas de 96 poços (10⁵ células/ml para células aderentes ou 3 x 10⁵ células/ml para as células leucêmicas). Os extratos testados (25 mg/mL) foram dissolvidos em DMSO a 1%, seguidamente adicionados a cada poço e incubados durante 72 h. Os grupos controle receberam uma mesma quantidade de DMSO. Após 72 h de tratamento, 25 µL de MTT (concentração de 5 mg/ml) foram adicionados, três horas mais tarde, o produto formazana obtido do MTT foi dissolvido em 100 ml de DMSO, e a absorbância foi medida a 595 nm em aparelho espectrofotométrico de leitura de microplacas. Os valores de IC₅₀ e seus intervalos de confiança de 95% para dois experimentos diferentes foram obtidos por regressão não linear, utilizando o programa Graphpad Prism (Software intuitivo para a Ciência, San Diego, CA) (BARROS et al., 2014).

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos desvios no programa GraphPad Prism 5. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas e os resultados expressos em percentual de inibição de

crescimento, para os quais: amostra sem atividade, quando 1 a 20% de inibição; com pouca atividade, com inibição de crescimento celular de 20 a 50%; com atividade moderada, com inibição de crescimento celular variando entre 50 e 70%; e, com alta atividade, com inibição de crescimento variando entre 70 e 100% (FOUCHE *et al.*, 2008).

4.7 Avaliação da capacidade inibitória na produção de óxido nítrico em RAW 264.7

Para avaliar-se a produção de óxido nítrico (NO), as concentrações de nitrito (metabólito estável do NO) foram mensuradas baseando-se metodologia de Griess. Para realização do teste, células RAW 264.7 (5×10^5 células/mL) foram inoculadas em placa de 96 poços, na presença dos extratos diluídos (100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e 12,5 µg/mL) em LPS e, logo após, foram incubadas por 24 horas. Após a incubação, 50 µL do sobrenadante da cultura foram coletados para avaliação da produção de NO. Como controle negativo foi usado sobrenadante da cultura de macrófagos não tratado e não estimulado com LPS e como controle positivo macrófagos estimulados com LPS (1 µg/ml) e não tratados. Sob a proteção da luz, foram adicionados 50 µL do reagente de Griess (sulfanilamida 1%, N-(1-naftil) etilenodiamina dicloridrato 0,1%, H₃PO₄ 5%) e a absorbância foi medida após 10 minutos, em leitor de microplacas a 540 nm.

Os resultados foram expressos em valores de média \pm desvio padrão e foram analisados pelo teste One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Dunnett. Os grupos foram analisados com grau de significância de $p < 0,05$. A análise foi realizada no software GraphPad Prism 5.0[®].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Prospecção Fitoquímica

A triagem fitoquímica dos quatro extratos revelou a presença de vários metabólitos, conforme Tabela 6. O extrato hexânico de *Hyptis pectinata* apresentou mono e sesquiterpenos, além de triterpenos e esteroides. Já nos extratos acetato de etila e etanólico, foram encontradas cumarinas, flavonoides, taninos hidrolisáveis e condensados, mono e sesquiterpenos, triterpenos e esteroides. Por fim, no extrato aquoso se observaram a presença de cumarinas, flavonoides, taninos hidrolisáveis e abundante quantidade de saponinas. Nenhum dos quatro extratos evidenciou a presença de antraquinonas e alcaloides.

Lira e colaboradores (2006), nos testes preliminares de fitoquímica, detectaram no extrato bruto aquoso das folhas de *Hyptis pectinata*, a presença de alcaloides, taninos e flavonoides. Os demais estudos seguiram o mesmo padrão da família Lamiaceae, ou seja, predominância de metabólitos da via do acetato-mevalonato, mas com algumas substâncias de origem biossintética mista e da via do ácido chiquímico (FALCÃO; MENEZES, 2003).

Tabela 6. Prospecção fitoquímica dos extratos brutos de *Hyptis pectinata* (L.) Poit

Metabólitos	Ext. Hex.	Ext. AcOEt	Ext. EtOH	Ext. Aq.
Alcaloides	-	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-
Cumarinas	-	+	+	+++
Flavonoides	+	+	+	+
Mono e Sesquiterpenos	+++	++	+	-
Taninos Condensados	-	+	+	+
Taninos Hidrolisáveis	-	+	+	+++
Triterpenos e Esteroides	++	+	+	-
Saponinas	-	-	-	+++
Rendimento (%)	6,3	2,6	2,6	6

Ext. Hex. : Extrato Hexânico; Ext. AcOEt: Extrato Acetato de Etila; Ext. EtOH: Extrato Etanólico; Ext. Aq. : Extrato Aquoso; + Poucas bandas; ++ Abundantes bandas; +++ Muitas bandas; - Ausente.

5.2 Análise do óleo essencial de *Hyptis pectinata*

5.2.1. Rendimento do óleo essencial de *Hyptis pectinata*

O rendimento do óleo essencial foi de aproximadamente 0,11% (v/p), valor próximo aos obtidos por Pietschmann (1998), Lira (2006) e Lima (2013), que foram 0,1 % (v/p) 0,14% (v/p) e 0,1% (v/p), respectivamente. Rendimentos distintos foram encontrados por outros autores: 0,8% (v/p) por Pereira et al. (2014); 0,6% (v/p) por Tchoumboungang et al.; 0,5% (v/p) por Raymundo et al. (2011), Arrigoni-Blank et al. (2008), Santos et al. (2008) e Nascimento (2007). Embora um dos estudos tenha demonstrado que o local da coleta não influencia significativamente sobre o rendimento do óleo essencial (ARRIGONI-BLANK et al., 2008), outro evidenciou um importante aumento no teor do OE de *Hyptis pectinata*, quando estas foram submetidas a um severo estresse hídrico (CARVALHO; MARTINS; MOREIRA, 2012). Arrigoni-Blank (2008) e colaboradores notaram não haver diferenças relevantes em relação ao rendimento do óleo essencial, quando diferentes horários de colheita foram empregados.

Apesar de o rendimento calculado estar de acordo com alguns dos que foram encontrados na literatura, é importante deixar claro que diferentes metodologias podem ter sido empregadas, por exemplo, no método de partição. Além disso, a perda de quantidade relevante do óleo essencial, que ficou aderido às paredes dos recipientes utilizados na extração, pode justificar as discrepâncias apresentadas.

5.2.2 Análise química do óleo essencial de *Hyptis pectinata*

Após a caracterização do Óleo Essencial de *Hyptis pectinata* por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG/EM), foram identificados 14 componentes, conforme está evidenciado na Tabela 11. Dentre as moléculas encontradas, todas foram sesquiterpenos (Figura 8). Os compostos majoritários foram o β -cariofileno (4) e o Germacreno-D (5) e ambos representaram 47,6% do total identificado na amostra. O β -cariofileno e Germacreno-D também foram encontrados como principais constituintes por Lira (2006) e foram equivalentes a 46,12 % da amostra identificada.

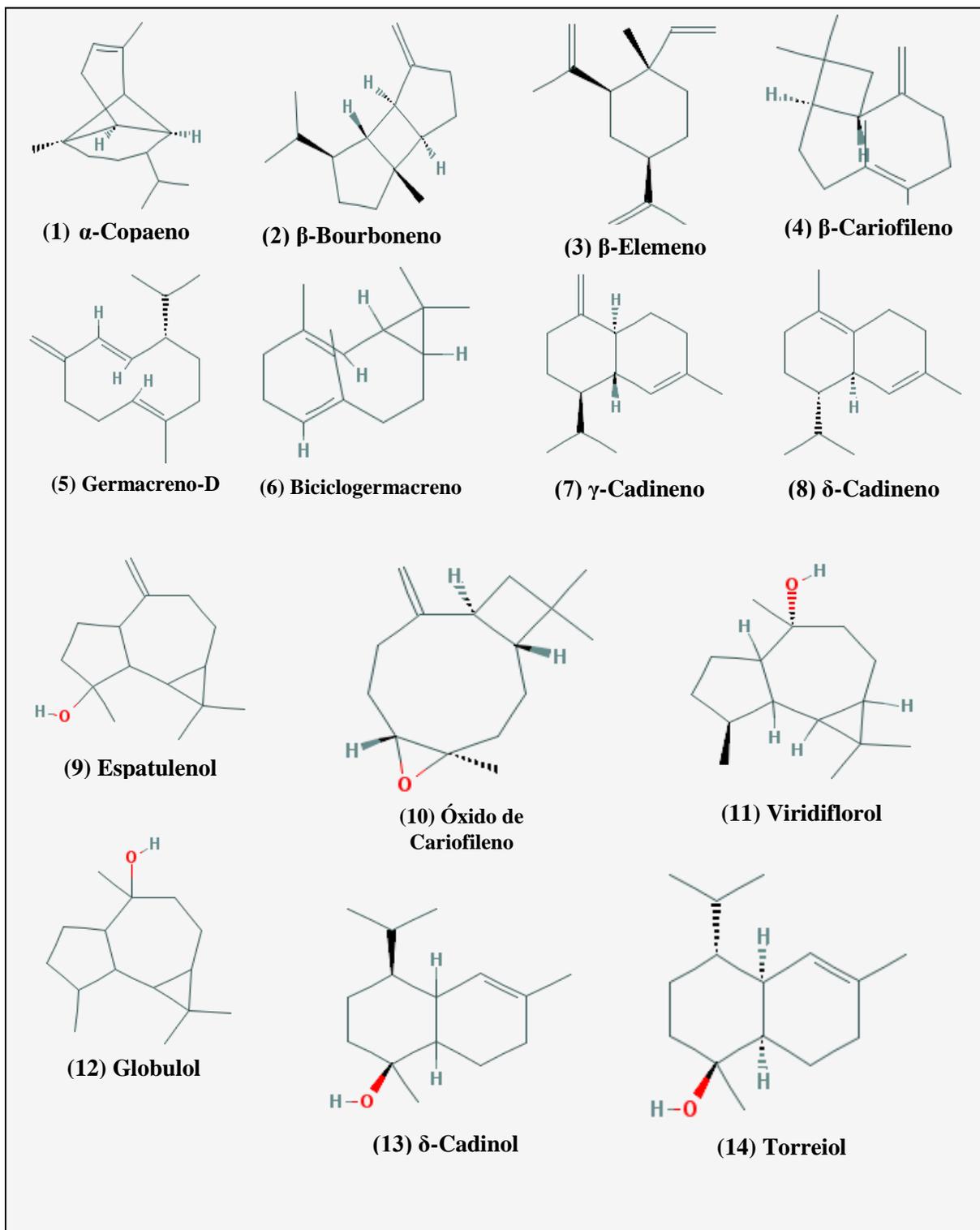
Tabela 7. Composição química do Óleo Essencial de *Hyptis pectinata*

COMPOSTO	TR*	TEOR MÉDIO (%)
(1) Alfa-Copaeno	38.49	2,55
(2) Beta-Bourboneno	39.05	1,52
(3) Beta-Elemeno	39.29	2,08
(4) Beta-Cariofileno**	41.13	31,78
(5) Germacreno-D**	45.08	15,82
(6) Bicyclgermacreno	45.86	9,15
(7) Gama-Cadineno	46.39	1,62
(8) Delta-Cadineno	46.61	3,96
(9) Espatuleno	47,85	3,29
(10) Óxido de Cariofileno	47.96	6,25
(11) Veridiflorol	48.09	1,88
(12) Globulol	48.26	0,57
(13) Delta-Cadinol	48.68	5,89
(14) Torreiol	48.75	0,61
Monoterpenos		0
Sesquiterpenos		86,97
Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos		68,48
Sesquiterpenos Oxigenados		18,49
TOTAL IDENTIFICADO		86,97

*Tempo de retenção; **Componentes majoritários

Três estudos realizados no estado de Sergipe, um no Rio de Janeiro e outro realizado na Paraíba, evidenciaram a maior presença de β -cariofileno e óxido de cariofileno nas análises realizadas (MENEZES et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2008; PEREIRA, 2014; RAYMUNDO et al., 2011; SILVA, 2006).

Figura 8. Estruturas químicas dos componentes do óleo essencial de *Hyptis pectinata* (L.) Poit



Arrigoni-Blank e colaboradores (2008) investigaram a composição do óleo essencial de seis diferentes genótipos de *Hyptis pectinata* e também encontraram a predominância dos sesquiterpenos em suas constituições. Das seis amostras analisadas, quatro tiveram o β -cariofileno como principal componente. Outro estudo realizado pelo mesmo grupo, também constatou a maior presença de sesquiterpenos no óleo essencial de *Hyptis pectinata*, embora a calamusenona tenha sido o composto prevalente (BLANK et al., 2010).

Ainda com relação à caracterização do OE de *Hyptis pectinata*, um estudo realizado na República de Camarões e outro em Cabo Verde, estabeleceram a predominância do β -cariofileno e do β -elemeno (TCHOUMBOUGNANG et al., 2005) e do germacreno-D e do β -cariofileno, respectivamente (LIMA, 2013).

No que concerne às diferenças apresentadas em relação às constituições do óleo essencial de *Hyptis pectinata*, elas podem estar relacionadas às variações genéticas dentro da espécie, clima, tipo de solo, estação do ano, técnica de extração, localização geográfica, entre outras (SANTOS et al., 2008).

Ao β -cariofileno, composto majoritário encontrado pela análise realizada, são atribuídas importantes atividades, tais como: antibacteriana (SANTOS et al., 2008), antileishmania, antifúngica e anti-inflamatória. Embora o germacreno-D não tenha demonstrado possuir atividade antimicrobiana isoladamente, este composto é um dos constituintes majoritários de óleos essenciais com atividade antimicrobiana comprovada e pode agir de forma sinérgica aos outros compostos (FRANCESCATO et al., 2007). Já o biciclogermacreno, um dos compostos majoritários desta análise, apresenta atividade antimicrobiana já demonstrada e, provavelmente, age em sinergismo com alguns dos compostos minoritários dos constituintes dos óleos essenciais (SANTOS et al., 2013).

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, observou-se que o óleo essencial de *Hyptis pectinata* apresentou consonância com as elucidações realizadas por outros autores, principalmente no que diz respeito aos constituintes encontrados. Desta forma, é importante salientar que os dados aqui levantados fornecem perspectivas quanto aos futuros testes que serão realizados.

5.3 Atividade antimicrobiana dos extratos de *Hyptis pectinata*

5.3.1 Atividade antimicrobiana do Extrato hexânico de *Hyptis pectinata* (ExtHex-Hp)

O extrato hexânico de *Hyptis pectinata* foi considerado ativo ou muito ativo frente às cepas Gram-positivas utilizadas nos ensaios (Tabela 7). O maior halo de inibição apresentado foi de 31 mm, na concentração de 10 mg/poço, para a cepa de *Micrococcus luteus* (AM 1200); houve também inibição de crescimento das cepas de *Staphylococcus aureus* AM 103, para a qual o extrato apresentou halos de 20 mm, na concentração de 10 mg/poço; AM 106, cujos halos foram de 23 mm e 20 mm, nas concentrações de 10 mg/poço e 5 mg/poço, respectivamente; e, frente à cepa de *Staphylococcus aureus* AM 1235, com halos de 21 mm e 18 mm, nas concentrações de 10 mg/poço e 5 mg/poço, respectivamente. Em relação às cepas *Staphylococcus* coagulase-negativas, uma delas, a AM 1198 não apresentou halos de inibição. Já, frente às outras duas cepas, *Staphylococcus* coagulase-negativo AM 235 e AM 1162, o extrato demonstrou-se ativo e muito ativo, com halos de 23 mm e 19 mm (a 10 mg/poço e 5 mg/poço, respectivamente) para a primeira e de 18 e 15 mm (a 10 mg/poço e 5 mg/poço, respectivamente) para a segunda.

No que diz respeito às cepas Gram-negativas, apenas frente uma delas, o extrato apresentou atividade: *Salmonella enterica* AM 1280, com halos de 17 mm e 14 mm nas duas maiores concentrações. O ExtHex-Hp não teve atividade frente às leveduras dos testes. Para todos os experimentos realizados, os antimicrobianos padrões confirmaram o perfil de sensibilidade/resistência das bactérias ensaiadas.

As concentrações mínimas inibitórias confirmaram os resultados preliminares obtidos pela técnica de poços. Diante disso, foi notada boa atividade frente à cepa Gram-negativa *Salmonella enterica* AM 1280, com CMI de 125 µg/mL. Para as cepas de *Staphylococcus aureus* AM 103, *Staphylococcus* coagulase-negativa AM 235 e *Micrococcus luteus* AM 1200, o extrato também foi ativo, estabelecendo CMI de 500 µg/mL. Já em relação às cepas *Staphylococcus aureus* AM 106 e *Staphylococcus* coagulase-negativa AM 1162, ExtHex-Hp apresentou moderada atividade, com CMI \geq 1000 µg/mL.

Na triagem fitoquímica preliminar, o extrato bruto hexânico de *Hyptis pectinata* demonstrou maior presença de mono e sesquiterpenos, triterpenos e esteroides. Esta atividade deve-se ao fato de que os terpenos também são substâncias terapêuticas contra bactérias, fungos, vírus e protozoários. Apesar da pouca elucidação de seu mecanismo de ação, postula-se que são

capazes de agir contra os microrganismos devido ao caráter lipofílico de suas moléculas facilitando a interação da membrana com estas estruturas. Desta interação, resultam uma expansão da membrana citoplasmática, o aumento de permeabilidade, a inibição da respiração e a alteração do transporte de íons, ocasionando uma desorganização e ruptura da membrana citoplasmática (COWAN, 1999; TROMBETTA et al., 2005; DEMO, 2008).

Tabela 8. Atividade antimicrobiana do extrato hexânico de *Hyptis pectinata* frente cepas de interesse clínico.

CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS	TÉCNICA DE POÇOS HALOS DE INIBIÇÃO (em milímetros)				CMI** (µg/mL)
	10 mg/poço	5 mg/poço	2,5 mg/poço	Padrão*	
<i>Staphylococcus aureus</i> AM ¹ 103	20	17	16	43	500
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 106	23	20	16	36	1000
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 1235	21	18	12	35	250
<i>Staphylococcus coagulase-negativa</i> AM 235	23	19	15	37	500
<i>Staphylococcus coagulase-negativa</i> AM 1162	18	15	12	30	>1000
<i>Staphylococcus coagulase-negativa</i> AM 1198	--	--	--	31	NT
<i>Micrococcus luteus</i> AM 1200	--	--	--	44	500
<i>Escherichia coli</i> AM 251	--	--	--	36	NT
<i>Escherichia coli</i> AM 1181	--	--	--	38	NT
<i>Klebsiella pneumoniae</i> AM 342	--	--	--	37	NT
<i>Klebsiella pneumoniae</i> AM 411	--	--	--	36	NT
<i>Salmonella enterica</i> AM 1280	--	--	--	28	125
<i>Salmonella sp.</i> AM 1282	--	--	--	35	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AM 457	--	--	--	27	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AM 458	--	--	--	25	NT
<i>Proteus mirabilis</i> AM 1115	--	--	--	39	NT

1: AM – Coleção de Linhagens do Laboratório de Análises Microbiológicas - UFPE; * Padrão utilizado: Tetraciclina 30 µg (Gram-positivas); Ceftriaxona 30 µg (Gram-negativas); --: Sem halo de inibição; **Concentração Mínima Inibitória em µg/ML. NT: Não testado.

5.3.2 Atividade antimicrobiana do extrato acetato de etila de *Hyptis pectinata* (ExtAcOEt-Hp)

O extrato acetato de etila de *Hyptis pectinata* mostrou-se muito ativo para as cepas Gram-positivas; muito ativo, ativo ou pouco ativo para as bactérias Gram-negativas e inativo para as cepas leveduriformes.

Os halos de inibição apresentados para a cepa Gram-positiva *Staphylococcus aureus* AM 106, foram 27, 23 e 19 mm, nas concentrações de 10, 5 e 2,5 mg/poço, respectivamente. Apenas uma cepa Gram-positiva, *Micrococcus luteus* AM 1200, não apresentou halo de inibição na concentração de 2,5 mg/poço.

Dentre as cepas Gram-negativas, o extrato mostrou-se mais ativo frente *Proteus mirabilis* AM 1115, com halo de 19 mm na concentração mais alta. O ExtAcOEt-Hp foi ativo nas três concentrações utilizados apenas frente *Salmonella enterica* AM 1280, com halos de 24, 21 e 14 mm, nas concentrações de 10, 5 e 2,5 mg/poço, respectivamente. As cepas de *Klebsiella pneumoniae* AM 342 e 411 denotaram os menores halos de inibição do extrato.

Com relação às cepas Gram-positivas, o extrato acetato de etila de *Hyptis pectinata* evidenciou melhores atividades de CMI diante de *Staphylococcus aureus* AM 1235, *Staphylococcus coagulase-negativa* AM 1198 e *Micrococcus luteus* AM 1200, com resultados de 250, 500 e 500 µg/mL, respectivamente. Para as outras bactérias Gram-positivas testadas, o extrato foi moderadamente ativo (CMI = 1000 µg/mL).

Para as cepas Gram-negativas, melhores resultados puderam ser observados frente às linhagens de *Salmonella*, cujas CMI foram de 125-250 µg/mL, enquanto que diante de *Pseudomonas aeruginosa* AM 457 e *Escherichia coli* AM 1281, o extrato foi moderadamente ativo.

O extrato bruto acetato de etila de *Hyptis pectinata* apresentou maior variedade de metabólitos secundários em relação ao extrato bruto hexânico. A atividade antimicrobiana encontrada deveu-se, provavelmente, à presença de compostos fenólicos (taninos e cumarinas), juntamente com monoterpenos e sesquiterpenos, o que pode justificar um possível sinergismo entre esses metabólitos secundários.

Diversas atividades biológicas têm sido atribuídas aos taninos, tais como: ação antimicrobiana, moluscicida e antitumoral; também ajudam no processo de cura de feridas, queimaduras e inflamações através da formação de uma camada protetora sobre a pele ou mucosa

danificada. Postula-se que as atividades farmacológicas (dentre elas, a antimicrobiana) dos taninos se devem a três propriedades: complexação com íons metálicos, atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e habilidade de se complexar com macromoléculas como proteínas e polissacarídeos (MELLO; SANTOS, 2004).

Assim como os taninos, compostos cumarínicos também possuem propriedades inibitórias do crescimento bacteriano reconhecidas, ainda que não se tenha esclarecido totalmente o mecanismo de ação antimicrobiano destas substâncias.

Tabela 9. Atividade antimicrobiana do Extrato seco Acetato de Etila de *Hyptis pectinata* frente cepas de interesse clínico.

CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS	TÉCNICA DE POÇOS HALOS DE INIBIÇÃO (em milímetros)				CMI** (µg/mL)
	10 mg/poço	5 mg/poço	2,5 mg/poço	Padrão*	
<i>Staphylococcus aureus</i> AM ¹ 103	26	23	19	46	1000
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 106	27	23	19	42	1000
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 1235	24	21	13	36	250
<i>Staphylococcus coagulase-negativa</i> AM 235	25	21	14	39	1000
<i>Staphylococcus coagulase-negativa</i> AM 1162	24	20	14	39	1000
<i>Staphylococcus coagulase-negativa</i> AM 1198	20	18	--	29	500
<i>Micrococcus luteus</i> AM 1200	34	26	--	51	500
<i>Escherichia coli</i> AM 251	13	--	--	35	NT
<i>Escherichia coli</i> AM 1181	14	11	--	31	1000
<i>Klebsiella pneumoniae</i> AM 342	12	--	--	36	NT
<i>Klebsiella pneumoniae</i> AM 411	12	10	--	35	NT
<i>Salmonella enterica</i> AM 1280	24	21	14	30	125
<i>Salmonella sp.</i> AM 1282	15	11	--	34	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AM 457	14	11	--	27	1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AM 458	13	10	--	25	NT
<i>Proteus mirabilis</i> AM 1115	19	10	--	37	1000

1: AM – Coleção de Linhagens do Laboratório de Análises Microbiológicas - UFPE; * Padrão utilizado: Tetraciclina 30 µg (Gram-positivas); Ceftriaxona 30 µg (Gram-negativas); --: Sem halo de inibição; **Concentração Mínima Inibitória em µg/ML. NT: Não testado.

5.3.3 Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *Hyptis pectinata* (ExtEtOH-*Hp*)

O extrato etanólico de *Hyptis pectinata* demonstrou discreta atividade frente às cepas ensaiadas, sendo pouco ativo ou inativo, predominantemente. Os melhores resultados apresentados foram diante das cepas Gram-positivas, dentre elas, *Micrococcus luteus* AM 1200, com halos de 19 e 15 mm, nas concentrações de 10 mg/poço e 5 mg/poço, respectivamente. Para as bactérias Gram-negativas, os resultados também foram pouco expressivos, embora uma delas, *Salmonella enterica* AM 1280, tenha exibido halos de inibição de 12 e 11 mm, nas maiores concentrações ensaiadas. Assim como nos extratos hexânico e acetato de etila, não houve atividade para as leveduras.

A tabela 9 evidencia os halos de inibição e os resultados da Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos microrganismos utilizados nos ensaios.

Quanto aos resultados das CMI, o ExtEtOH-*Hp* foi ativo frente às cepas de *Staphylococcus coagulase-negativa* AM 1198 e *Micrococcus luteus* AM 1200, apresentando para ambos os microrganismos, CMI de 500 µg/mL.

Embora tenham sido encontrados os mesmos metabólitos secundários na triagem fitoquímica dos extratos acetato de etila e etanólico, o primeiro apresentou ligeira diferença na quantidade de bandas presentes para o teste de monoterpenos e sesquiterpenos, o que pode justificar a notável diferença nos resultados apresentados para a atividade antimicrobiana, principalmente frente linhagens Gram-negativas.

Tabela 10. Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *Hyptis pectinata* frente cepas de interesse clínico.

CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS	TÉCNICA DE POÇOS HALOS DE INIBIÇÃO (em milímetros)				CMI** (µg/mL)
	10 mg/poço	5 mg/poço	2,5 mg/poço	Padrão*	
<i>Staphylococcus aureus</i> AM ¹ 103	11	10	--	32	NT
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 106	13	11	--	36	NT
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 1235	11	10	--	32	NT
<i>Staphylococcus coagulase-negativa</i> AM 235	11	10	--	31	NT
<i>Staphylococcus coagulase-negativa</i> AM 1162	12	10	--	31	NT
<i>Staphylococcus coagulase-negativa</i> AM 1198	14	12	--	29	500
<i>Micrococcus luteus</i> AM 1200	19	15	--	47	500
<i>Escherichia coli</i> AM 251	--	--	--	34	NT
<i>Escherichia coli</i> AM 1181	--	--	--	34	NT
<i>Klebsiella pneumoniae</i> AM 342	--	--	--	32	NT
<i>Klebsiella pneumoniae</i> AM 411	--	--	--	30	NT
<i>Salmonella enterica</i> AM 1280	--	--	--	28	NT
<i>Salmonella sp.</i> AM 1282	12	11	--	34	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AM 457	--	--	--	30	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AM 458	--	--	--	32	NT
<i>Proteus mirabilis</i> AM 1115	--	--	--	35	NT

1: AM – Coleção de Linhagens do Laboratório de Análises Microbiológicas - UFPE; * Padrão utilizado: Tetraciclina 30 µg (Gram-positivas); Ceftriaxona 30 µg (Gram-negativas); --: Sem halo de inibição; **Concentração Mínima Inibitória em µg/ML. NT: Não testado.

5.3.4 Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Hyptis pectinata* (ExtAq-Hp)

O extrato aquoso de *Hyptis pectinata* (ExtAq-Hp) apresentou atividade frente às cepas Gram-positivas, porém, frente às Gram-negativas, o extrato demonstrou pouca ou nenhuma atividade. As leveduras não apresentaram sensibilidade ao extrato. Todos os resultados estão expressos na Tabela 10.

Os halos de inibição foram expressivos para todas as cepas Gram-positivas, principalmente *Staphylococcus aureus* AM 103, AM 106 e AM 1235 e *Staphylococcus coagulase-negativas* AM 235, AM 1162 e AM 1198. A menor das concentrações utilizadas (2,5 mg/poço) foi muito ativa diante das bactérias de *Staphylococcus aureus* AM 106 e AM 1235, *Staphylococcus coagulase-negativa* AM 1162 e 1198 e *Micrococcus luteus* AM 1200, com halos de inibição de 14 mm, 14 mm, 13 mm, 15 mm e 13 mm, respectivamente.

Dentre as Gram-negativas, apenas *Klebsiella pneumoniae* AM 342, *Salmonella enterica* AM 1280 e *Proteus mirabilis* tiveram halos de inibição relevantes, embora isto tenha sido na maior das concentrações (10 mg/poço).

O extrato aquoso de *Hyptis pectinata* apresentou atividade relevante frente às cepas Gram-positivas *Staphylococcus aureus* AM 103, *Staphylococcus coagulase-negativa* AM 1162 e *Staphylococcus coagulase-negativa* AM 1198. As concentrações mínimas que inibiram o crescimento estiveram entre 250 e 500 µg/mL.

Enquanto isso, apenas para uma das cepas Gram-negativas utilizadas o extrato teve baixa CMI, *Salmonella enterica* AM 1280, de 250 µg/mL. Para as demais bactérias Gram-negativas, ExtAq-Hp apresentou baixa ou moderada atividade, com CMI \geq 1000 µg/mL.

A maior presença de compostos fenólicos (cumarinas e taninos) no extrato aquoso de *Hyptis pectinata* em relação aos outros extratos obtidos provavelmente justifica a relevante atividade antimicrobiana encontrada. O mais provável mecanismo de ação destes compostos foi evidenciado por alguns autores e sua ação sobre a atividade antibacteriana envolve a inibição enzimática pela oxidação de seus componentes através de reações com os grupamentos sulfidrilas e de interações inespecíficas (relacionadas com o caráter hidrofóbico dessas moléculas) com os grupamentos tiol das proteínas (DEMO, 2008; GIBBONS, 2004).

Tabela 11. Atividade antimicrobiana do Extrato seco Aquoso de *Hyptis pectinata* frente cepas de interesse clínico.

CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS	TÉCNICA DE POÇOS HALOS DE INIBIÇÃO (em milímetros)				CMI** (µg/mL)
	10 mg/poço	5 mg/poço	2,5 mg/poço	Padrão*	
<i>Staphylococcus aureus</i> AM ¹ 103	21	17	12	34	500
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 106	18	18	14	36	1000
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 1235	20	16	14	37	1000
<i>Staphylococcus coagulase-negativa</i> AM 235	17	13	12	31	1000
<i>Staphylococcus coagulase-negativa</i> AM 1162	19	17	13	29	500
<i>Staphylococcus coagulase-negativa</i> AM 1198	25	20	15	28	250
<i>Micrococcus luteus</i> AM 1200	19	15	13	43	1000
<i>Escherichia coli</i> AM 251	10	10	10	33	NT
<i>Escherichia coli</i> AM 1181	--	--	--	36	NT
<i>Klebsiella pneumoniae</i> AM 342	13	12	11	35	>1000
<i>Klebsiella pneumoniae</i> AM 411	12	11	11	33	NT
<i>Salmonella enterica</i> AM 1280	17	14	12	33	250
<i>Salmonella sp.</i> AM 1282	10	10	10	30	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AM 457	12	11	11	23	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AM 458	12	11	11	25	NT
<i>Proteus mirabilis</i> AM 1115	13	12	12	40	1000

1: AM – Coleção de Linhagens do Laboratório de Análises Microbiológicas - UFPE; * Padrão utilizado: Tetraciclina 30 µg (Gram-positivas); Ceftriaxona 30 µg (Gram-negativas); --: Sem halo de inibição; **Concentração Mínima Inibitória em µg/ML. NT: Não testado.

Os resultados encontrados por outros autores foram condizentes com os que foram evidenciados neste trabalho. As melhores atividades foram observadas frente aos microrganismos Gram-positivos, apesar de terem sido encontrados resultados significativos também frente às Gram-negativas *Salmonella enterica* AM 1280 e *Salmonella* sp. AM 1282, *Pseudomonas aeruginosa* AM 457 e *Proteus mirabilis* AM 1115. Em relação às leveduras, os extratos não apresentaram atividade.

De uma forma geral, os extratos considerados mais ativos foram o acetato de etila e o aquoso. Este potencial pode estar relacionado à maior presença de compostos fenólicos em ambos, de terpenos no extrato acetato de etila e à predominância de saponinas no extrato aquoso. Contudo, no que diz respeito à atividade frente cepas Gram-negativas, a menor inibição dos extratos utilizados contra bactérias desta natureza pode ser atribuída à presença de outra membrana externamente à sua parede celular, agindo como uma barreira para substâncias, incluindo antibióticos (NIKAIDO; VAARA, 1985), ou devido à barreira de permeabilidade proporcionada pela parede celular ou, ainda, devido ao mecanismo de acumulação de enzimas no espaço periplasmático dessas bactérias (ADWAN, 1998; WEBER-SOBRINHO, 2010).

5.4 Avaliação da atividade citotóxica preliminar de *Hyptis pectinata*

5.4.1 Atividade citotóxica

Na Tabela 12, é possível observar-se os resultados de inibição e respectivos desvios-padrão dos quatro extratos frente às três linhagens celulares utilizadas nos testes. Individualmente, sobre a linhagem HEP-2 (Carcinoma de laringe), foram encontrados os maiores potenciais de inibição, sendo de 100% para o extrato hexânico, 107,1% para o extrato acetato de etila. Para a linhagem HL-60, o extrato hexânico apresentou inibição de 100%, enquanto o extrato acetato de etila demonstrou inibição de 98,7%.

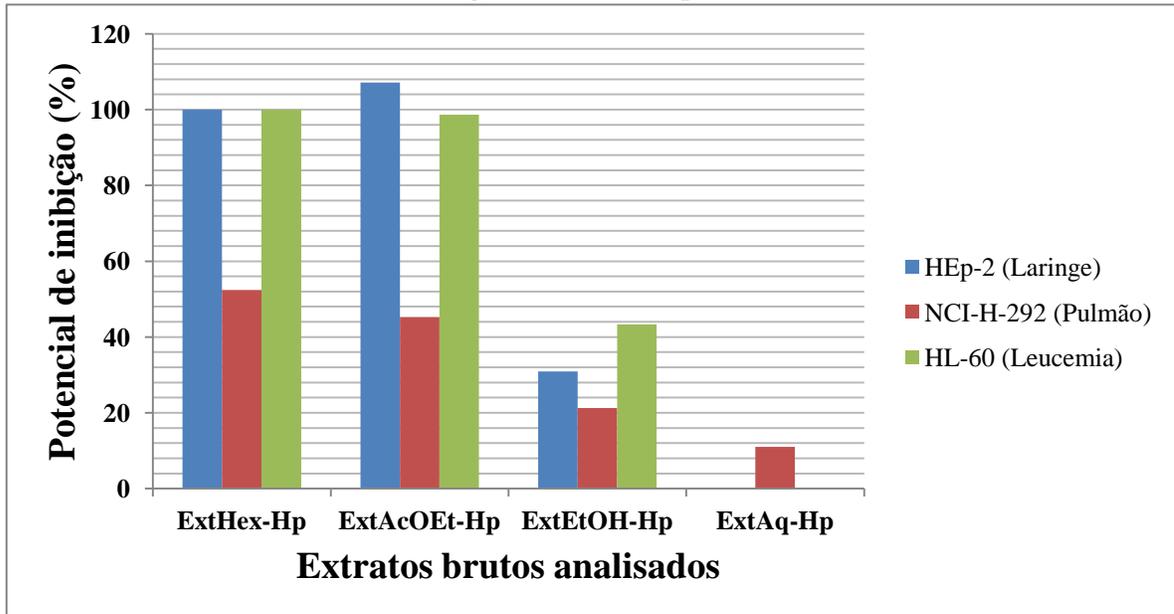
Tabela 12 - Resultados da Atividade Citotóxica dos Extratos das Folhas de *Hyptis pectinata* L. expressos em porcentagem de inibição da viabilidade celular.

EXTRATOS	HEp-2		NCI-H-292		HL-60	
	% de inibição	DP	% de inibição	DP	% de inibição	DP
ExtHex-<i>Hp</i>	100	0,9	52,4	3,6	100	1,2
ExtAcOEt-<i>Hp</i>	107,1	7,4	45,3	4,2	98,7	0,5
ExtEtOH-<i>Hp</i>	30,9	36,2	21,3	5,6	43,3	3,5
ExtAq-<i>Hp</i>	0	0	11	11,8	0	0
Cisplatina	100	2,4	85,6	2,2	96	1,1
Doxorrubicina	100	5,7	100	5,2	100	0,2

NCI-H-292: Carcinoma de Pulmão; HL-60: Leucemia promielocítica; H-Ep: Carcinoma de laringe humana; ExtHex-*Hp*: Extrato hexânico de *Hyptis pectinata*; ExtAcOEt-*Hp*: Extrato acetato de etila de *Hyptis pectinata*; ExtEtOH-*Hp*: Extrato etanólico de *Hyptis pectinata*; ExtAq-*Hp*: Extrato aquoso de *Hyptis pectinata*. DP: Desvio-padrão.

Os dados encontrados evidenciaram a existência de pouca atividade do extrato aquoso e etanólico frente todas as três linhagens celulares utilizadas no estudo, sendo o primeiro, menos ativo. Os extratos hexânico e acetato de etila apresentaram consideráveis inibições frente duas das Linhagens utilizadas, HL-60 e HEp-2 e moderada atividade frente à linhagem NCI-H-292, conforme pode ser observado pela Figura 9. Diante disso, a maior atividade encontrada foi a do extrato de menor polaridade, o hexânico, o qual, na análise fitoquímica, apresentou maior número de estruturas terpênicas. Pelo fato de os terpenos terem caráter lipídico, sua interação com a membrana plasmática torna-se facilitada, o que, conseqüentemente, pode justificar a atividade citotóxica visualizada.

Figura 9. Comparação entre os percentuais de inibição dos extratos brutos de *Hyptis pectinata* testados frente linhagens de células neoplásicas.



NCI-H-292: Carcinoma de Pulmão; HL-60: Leucemia promielocítica; HEP-2: Carcinoma epidermoide de laringe humana; ExtHex-Hp: Extrato hexânico de *Hyptis pectinata*; ExtAcOEt-Hp: Extrato acetato de etila de *Hyptis pectinata*; ExtEtOH-Hp: Extrato etanólico de *Hyptis pectinata*; ExtAq-Hp Extrato aquoso de *Hyptis pectinata*.

Barbosa e colaboradores (2012) demonstraram que o extrato hidroalcoólico de *Hyptis pectinata* evidenciou atividade citotóxica *in vitro* frente três linhagens tumorais e *in vivo* utilizando sarcoma 180 em ratos. Os ensaios preliminares demonstraram moderada citotoxicidade: 62% de inibição frente à linhagem celular HCT-8 (câncer de colo de útero), enquanto os testes *in vivo* apresentaram valores de inibição de 70,5% para sarcoma 180, o que corrobora os resultados encontrados para o presente estudo.

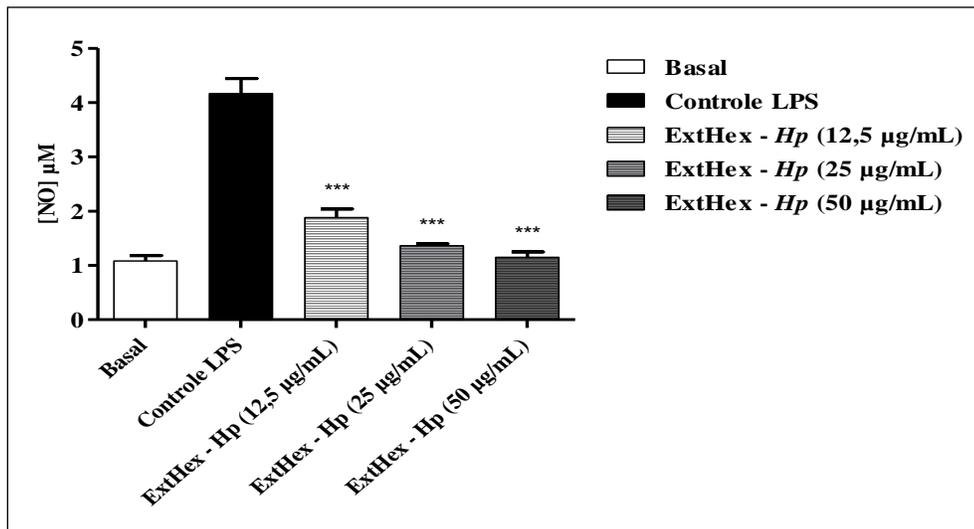
5.5 Atividade anti-inflamatória de *Hyptis pectinata*

Com relação à atividade anti-inflamatória dos extratos utilizados no presente trabalho, a formação do Óxido Nítrico (NO) foi verificada através da dosagem dos produtos de oxidação estáveis do seu metabolismo (nitritos). O NO é o principal mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas e constitui a mais importante molécula reguladora do sistema imune, tendo um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais. No entanto o

NO é potencialmente tóxico, particularmente, em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

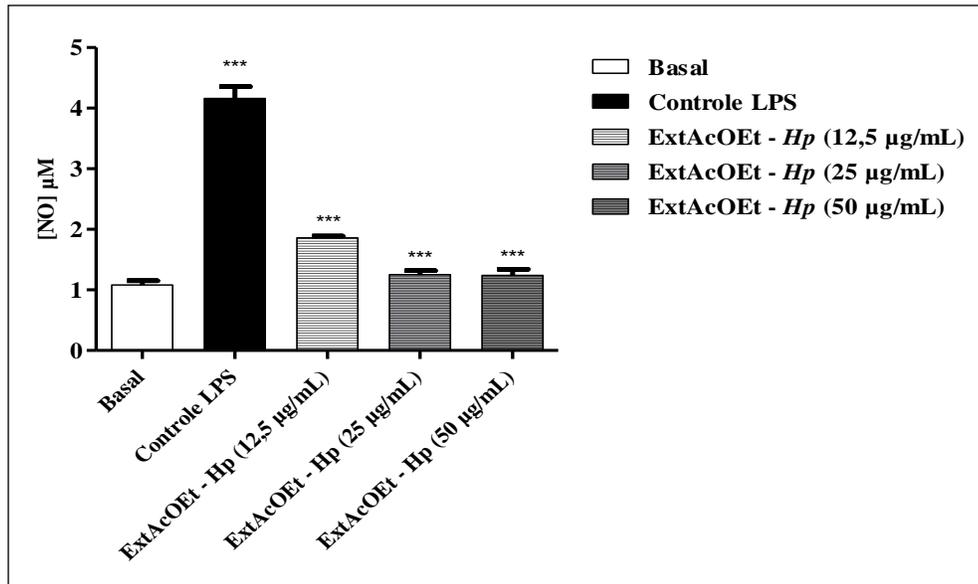
A atividade inibitória dos extratos na produção de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados por lipopolissacarídeo (LPS) foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Os grupos tratados com todos os extratos (Hexânico, Acetato de Etila, Etanólico e Aquoso) reduziram substancialmente os níveis de NO em todas as concentrações testadas, quando comparados aos resultados obtidos pelos macrófagos controles, apresentando inibição mais expressiva, conforme foram aumentadas as concentrações. Todos os resultados estão evidenciados nas figuras 10, 11, 12 e 13.

Figura 10. Avaliação da atividade inibitória do extrato hexânico de *Hyptis pectinata* (L.) Poit



*** $p < 0,05$ em relação ao controle positivo; Basal: Controle negativo - macrófagos não tratados e não estimulados; Controle LPS: Controle positivo - macrófagos estimulados por LPS; ExtHex-Hp - Extrato hexânico; ExtAcOEt-Hp - Extrato acetato de etila; ExtEtOH-Hp - Extrato etanólico; ExtAq-Hp - Extrato Aquoso.

Figura 11. Avaliação da atividade inibitória do extrato acetato de etila de *Hyptis pectinata* (L.) Poit

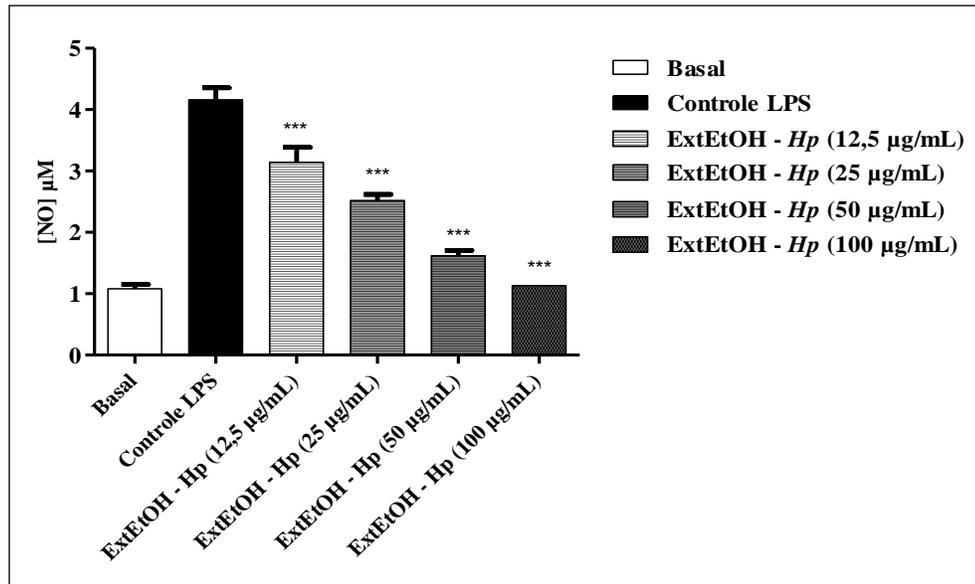


*** $p < 0.05$ em relação ao controle positivo; Basal: Controle negativo - macrófagos não tratados e não estimulados; Controle LPS: Controle positivo – macrófagos estimulados por LPS; ExtHex-*Hp* – Extrato hexânico; ExtAcOEet-*Hp* – Extrato acetato de etila; ExtEtOH-*Hp* – Extrato etanólico; ExtAq-*Hp* - Extrato Aquoso.

Para os extratos hexânico e acetato de etila, as maiores concentrações foram de 50 µg/mL. Nesta concentração, o primeiro apresentou maior potencial de inibição da produção de NO, demonstrando concentração final de $1,15 \pm 0,1$ µM; já o último apresentou concentração final de $1,24 \pm 0,1$ µM. Ambos os extratos apresentaram citotoxicidade nas concentrações de 100 µg/mL, o que justifica a ausência nos resultados.

Comparando-se a maior concentração comum para todos os extratos, 50 µg/mL, o extrato hexânico relatou a maior inibição da produção de NO, seguido pelo acetato de etila, o etanólico e, por último, o aquoso.

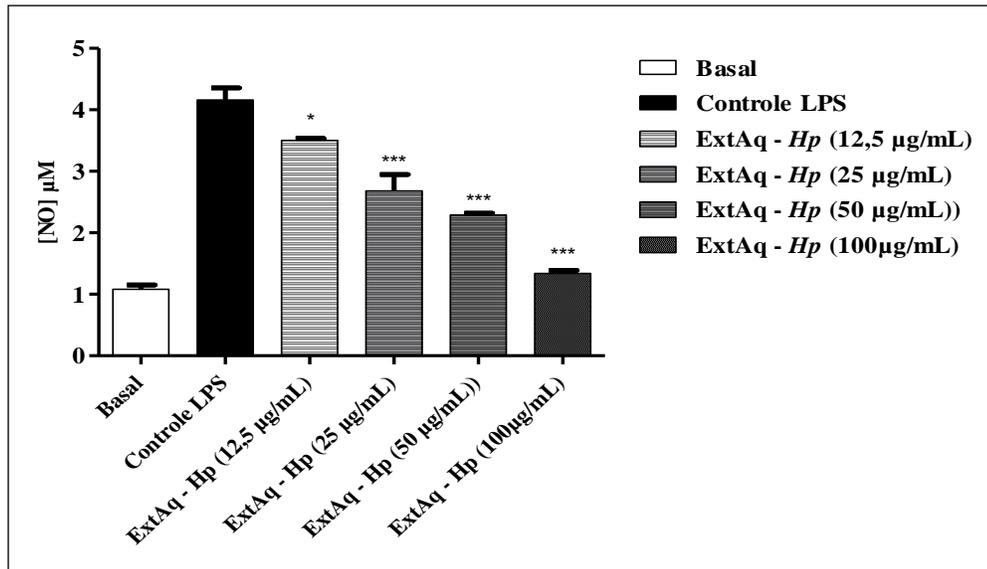
Figura 12. Avaliação da atividade inibitória do extrato etanólico de *Hyptis pectinata* (L.) Poit



*** $p < 0.05$ em relação ao controle positivo; Basal: Controle negativo - macrófagos não tratados e não estimulados; Controle LPS: Controle positivo – macrófagos estimulados por LPS; ExtHex-*Hp* – Extrato hexânico; ExtAcOEt-*Hp* – Extrato acetato de etila; ExtEtOH-*Hp* – Extrato etanólico; ExtAq-*Hp* - Extrato Aquoso.

Por não apresentarem toxicidade, os extratos etanólico e aquoso foram os únicos que tiveram suas atividades mensuradas na concentração de 100 μg/mL, o que se justifica pela toxicidade causada pelos extratos hexânico e acetato de etila nessa concentração. Os resultados encontrados foram 1,13 μM para o primeiro e 1,34 μM para o último. É importante ressaltar que, de forma geral, o extrato aquoso apresentou os resultados mais discretos (Figura 13).

Figura 13. Avaliação da atividade inibitória do extrato aquoso de *Hyptis pectinata* (L.) Poit



*** $p < 0.05$ em relação ao controle positivo; Basal: Controle negativo - macrófagos não tratados e não estimulados; Controle LPS: Controle positivo – macrófagos estimulados por LPS; ExtHex-*Hp* – Extrato hexânico; ExtAcOEt-*Hp* – Extrato acetato de etila; ExtEtOH-*Hp* – Extrato etanólico; ExtAq-*Hp* - Extrato Aquoso.

O extrato hexânico apresentou maior presença de compostos terpênicos (mono, sesqui e triterpenos) e de flavonoides. Schneider e colaboradores (2007) demonstraram a existência de um sinergismo entre terpenos e flavonoides em extratos de *Gingko biloba*, o qual seria capaz de explicar a diminuição da produção de mediadores inflamatórios, além de possuírem efeitos cardioprotetores, atuarem na rejeição em transplantes, asma e lesões isquêmicas devido a sua ação antagonista sobre o Fator de Agregação Plaquetária. Dentre as propriedades anti-inflamatórias dos flavonoides, está a diminuição nos produtos de NO, provavelmente acompanhada por um decréscimo no nível da enzima indutora de óxido-nítrico-sintetase – iNOS.

O extrato aquoso de *Hyptis pectinata* apresentou propriedade anti-inflamatória menor inibição da produção de NO em relação aos outros três extratos, fator que pode estar relacionado à ausência de mono e sesquiterpenos. Porém, a triagem fitoquímica revelou presença de uma classe de compostos com propriedade anti-inflamatória marcante: os taninos. Diante disso, torna-se essencial um estudo mais detalhado acerca das propriedades anti-inflamatórias dos extratos de *Hyptis pectinata*, tanto para os mais ativos nos testes preliminares, como para os menos ativos.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

- Do ponto de vista fitoquímico, diversas classes de metabólitos foram encontrados nos extratos de *Hyptis pectinata*, tais como: mono e sesquiterpenos, flavonoides, cumarinas, taninos hidrolisáveis e condensados, triterpenos e esteroides;
- A extração do óleo essencial de *Hyptis pectinata* apresentou rendimento semelhante a outros estudos encontrados descritos na literatura. Os componentes encontrados majoritariamente (β -cariofileno e Germacreno-D), também foram verificados em outros estudos;
- A atividade antimicrobiana dos extratos de *Hyptis pectinata* apresentou melhores resultados frente cepas Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativo* e *Micrococcus luteus*. Para as cepas Gram-negativas, melhores resultados puderam ser observados no extrato acetato de etila frente às *Salmonella*. Não foram identificados resultados frente aos fungos leveduriformes da espécie *Candida albicans*.
- Ainda com relação à atividade antimicrobiana, os extratos considerados mais ativos foram o acetato de etila e o aquoso. Este potencial pode estar relacionado à maior presença de compostos fenólicos em ambos, de terpenos no extrato acetato de etila e à predominância de saponinas no extrato aquoso. Esses metabólitos secundários possuem atividade antimicrobiana já relatada na literatura;
- No que diz respeito ao potencial citotóxico, destacaram-se as inibições frente duas das linhagens utilizadas, HEP-2 (Carcinoma de laringe) e HT-60 (Leucemia), pelos extratos hexânico e acetato de etila. A inibição frente à linhagem NCI-H-292 (Carcinoma de pulmão) foi moderada para ambos os extratos. Sugere-se então, que a inibição do crescimento tumoral do extrato hexânico de *Hyptis pectinata* esteja associada com a presença de estruturas terpênicas, enquanto o potencial de inibição do extrato acetato de etila de *Hyptis pectinata*, sugere-se que haja um sinergismo entre os compostos fenólicos e os terpenos,
- A atividade anti-inflamatória mensurou a inibição da produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos RAW 264.7 e na maior concentração comum para todos os extratos, 50 $\mu\text{g/mL}$, o extrato hexânico demonstrou a maior inibição da produção de NO, seguido pelo acetato de etila, o etanólico e, por último, o aquoso. Os extratos hexânico e acetato de etila de *H. pectinata* demonstraram citotoxicidade aos macrófagos RAW 264.7, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$.

REFERÊNCIAS

- ADEWUNMI, C. O. et al. Preliminary screening of some plant extracts for molluscicidal activity. **Planta medica**, v. 39, n. 1, p. 57-65, 1980.
- ADWAN, K.; ABU-HASAN, N. Gentamicin resistance in clinical strains of Enterobacteriaceae associated with reduced gentamicin uptake. **Folia microbiologica**, v. 43, n. 4, p. 438-440, 1998.
- ALMEIDA, R. N.; NAVARRO, D. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 8, n. 4, p. 310-322, 2001.
- ARRIGONI-BLANK, M. F. et al. Morphological, agronomical and pharmacological characterization of *Hyptis pectinata* (L.) Poit germplasm. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 298-303, 2005.
- ARRIGONI-BLANK, M. F. et al. Antinociceptive activity of the volatile oils of *Hyptis pectinata* L. Poit. (Lamiaceae) genotypes. **Phytomedicine**, v. 15, p. 334-339, 2008.
- BARROS, C. J. P. et al. A convenient synthesis and cytotoxic activity of 3-aryl-5-pentyl-1, 2, 4-oxadiazoles from carboxylic acid esters and arylamidoximes under solvent-free conditions. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 59, n. 1, p. 3-6, 2014.
- BASÍLIO, I. J. L. D. et al. Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, n. 4, p. 518-525, 2006.
- BERNARDI, A. A. C.; PIZZOLITTO, E. L.; PIZZOLITTO, A. C. Detecção da produção de slime por estafilococos coagulase-negativa isolados de cateter venoso central. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 28, n. 16, p. 57-66, 2007.
- BISPO, M. D. et al. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 81-86, 2001.
- BLANK, A. F. et al. Influência do horário de colheita e de secagem no óleo essencial de *Hyptis pectinata* L. Poit (Lamiaceae). **Scientia**, v. 6, p. 1-5, 2010.
- BOALINO, D. M. et al. α -Pyrones and a 2(5H)-furanone from *Hyptis pectinata*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 1303-1307, 2003.
- BORGES, F. K. et al. Perfil dos pacientes colonizados por enterobactérias produtoras de KPC em hospital terciário de Porto Alegre, Brasil. **Clinical And Biomedical Research**, v. 35, n. 1, p. 20-26, 2015.

BRUNETON, J. Elementos de fitoquímica y de farmacognosia. 1ª ed., Zaragoza, Espanha: Ed. Acribia, p. 189-213, 1991.

CARVALHO, J. S. B. DE; MARTINS, J. D. L.; MOREIRA, K. A. Respostas fisiológicas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. ao estresse hídrico. **REVISTA DE BIOLOGIA E CIÊNCIAS DA TERRA**, v. 12, n. 2, p. 20–28, 2012.

CINTRA-LIMA, I. C. P.; MATTOS-PIMENTA, C. A. DE. Estigma do câncer de pulmão: conceito, fatores associados e avaliação. **Investig. Enferm. Imagen Desarr**, v. 17, n. 1, p. 97–112, 2015.

CORDEIRO, D. N. D. G. **Significância Clínica Da Presença De *Staphylococcus* Coagulase-Negativo Isolados De Recém-Nascidos De Uma Unidade De Terapia Intensiva Neonatal Em Brasília - DF.** [s.l.] Dissertação de Mestrado em Medicina Tropical; Universidade de Brasília, 2007.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Nitric oxide revision. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343–350, 2003.

EVANGELISTA, S. S.; OLIVEIRA, A. C. *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido na comunidade : um problema mundial. v. 68, n. 1, p. 136–143, 2015.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. **Environmental Health**, v. 109, n. 1, p. 69–75, 2001.

FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. The *Hyptis* genus : an ethnopharmacological and chemical review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 84, n. 3, p. 69–74, 2003.

FALCAO, R. A. et al. Antileishmanial phenylpropanoids from the leaves of *Hyptis pectinata* (L.) poit. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

FEY, P. D. et al. Comparative Molecular Analysis of Community- or Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 196–203, 2003.

FIGUEIREDO, E. A. P. DE et al. *Pseudomonas aeruginosa*: frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, p. 421–427, 2007.

FRAGOSO-SERRANO, M.; GIBBONS, S.; PEREDA-MIRANDA, R. Anti-staphylococcal and cytotoxic compounds from *Hyptis pectinata*. **Planta Medica**, v. 71, p. 278–280, 2005.

FRANCESCATO, L. N. et al. Atividade antimicrobiana de *Senecio heterotrichius* DC. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 239–245, 2007.

GELATTI, L. C. et al. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 501–506, 2009.

GROSSA, P. Caracterização da resistência à oxacilina em estafilococos coagulase negativa isolados no Hospital de Clínicas de Curitiba - Paraná / n. June, 2015.

INCA. **Estimativa Incidência de câncer no Brasil - 2014**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>>. Acesso em: 21 maio. 2015.

INCA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.

KISANGAU, D. P.; HERRMANN, T. M. Utilization and conservation of medicinal plants used for primary health care in Makueni district, Kenya. **International Journal of Biodiversity Science, Ecosystems Services & Management**, v. 3, n. November 2014, p. 184–192, 2007.

KOBA, K. et al. Chemical Composition of *Hyptis pectinata* L., *H. lanceolata* Poit., *H. suaveolens* (L) Poit and *H. spicigera* Lam. Essential Oils from Togo. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 10, n. November 2014, p. 357–364, 2007.

KRÖEFF, V. N. et al. **Morfologia polínica de *Hyptis* JACQ. (Lamiaceae) no estado do Rio Grande do Sul, Brasil**. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, 2002.

LAGATOLLA, C. et al. Endemic Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with Acquired Metallo- β -lactamase Determinants in European Hospital. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 535–538, 2004.

LAGO, A.; FUENTEFRIA, S. R.; FUENTEFRIA, D. B. ESBL-producing enterobacteria in Passo Fundo, state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 430–434, 2010.

LIMA, I. S. M. **Medicinal and aromatic plants of Cape Verde : characterization of volatile metabolites of endemic and native species**. [s.l.] Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica; Faculdade de Coimbra, 2013.

LIMA, R. K. .; CARDOSO, M. G. Família Lamiaceae: Importantes Óleos Essenciais com Ação Biológica e Antioxidante. **Revista Fitos**, v. 3, n. 3, p. 14–24, 2007.

LIRA, A. F. **Toxicidade aguda e atividade antinociceptiva do extrato aquoso e óleo essencial da *Hyptis pectinata* L. poit (sambacaita), em modelo murino de artrite induzida por cristais de urato de sódio**. [s.l.] Dissertação de Mestrado em Medicina; Universidade Federal de Sergipe, 2006.

LOWY, F. D. Staphylococcus aureus Infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 520–532, 1998.

MALAQUIAS, G. et al. Utilização na medicina popular, potencial terapêutico e toxicidade em nível celular das plantas *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L. e *Mentha piperita* L. (Família Lamiaceae). **RevInter**, v. 7, n. 3, p. 50–68, 2014.

MELO, A. M. **Estudo Fitoquímico e Biológico da *Hyptis mutabilis* SALZ. (LAMIACEAE)**. [s.l.] Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Produtos Bioativos; Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

MELO, G. B. et al. Effect of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* on liver mitochondrial respiration. **Phytomedicine**, v. 12, p. 359–362, 2005.

MELO, G. B. et al. Enhancement of liver regeneration by the association of *Hyptis pectinata* with laser therapy. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, n. 5, p. 949–954, 2005b.

MENEZES, P. et al. Physicochemical Characterization and Analgesic Effect of Inclusion Complexes of Essential Oil from *Hyptis pectinata* L. Poit Leaves with α -Cyclodextrin. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 16, n. June, p. 440–450, 2015.

MICEK, S. T. et al. An international multicenter retrospective study of *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial pneumonia: impact of multidrug resistance. **Critical Care**, v. 19, p. 1–8, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: Inca. 128 p., 2011.

MOLAND, E. S. et al. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. January, p. 711–714, 2003.

MOTA, F. V. B. **Estudo das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva de novos derivados isoxazolina-acilhidrazonas**. [s.l.] Dissertação de Mestrado em Inovação Terapêutica; Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

NASCIMENTO, P. F. C. et al. *Hyptis pectinata* essential oil: Chemical composition and anti-*Streptococcus mutans* activity. **Oral Diseases**, v. 14, n. April 2007, p. 485–489, 2008.

OLIVEIRA, K. R. P. **β -lactamases na família Enterobacteriaceae: Métodos de detecção e prevalência**. [s.l.] Dissertação de Mestrado em Medicina – Ciências Médicas; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

PAIXÃO, M. S. et al. *Hyptis pectinata* gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 35-41, 2015.

PEREDA-MIRANDA, R. et al. Structure and stereochemistry of pectinolides A-C, novel antimicrobial and cytotoxic 5,6-dihydro-alpha-pyrones from *Hyptis pectinata*. **Journal of natural products**, v. 56, n. 4, p. 583–593, 1993.

PEREIRA, L. C. O. **Caracterização química de óleos essenciais de quatro espécies da família Lamiaceae: *Hyptis suaveolens* (L.) Poit, *Hyptis pectinata* (L.) Poit, *Hyptis martiusii* Benth. e *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer.** [s.l.] Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Farmácia; UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA, 2014.

PIETSCHMANN, M. et al. Volatile Constituents of *Hyptis pectinata* Poit. (Lamiaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, n. December 2014, p. 550–552, 1998.

RAYMUNDO, L. J. R. P. et al. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 3, p. 725–732, 2011.

ROJAS, A. et al. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 35, p. 275–283, 1992.

SANTOS, P. O. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1648–1652, 2008.

SANTOS, T. G. et al. Chemical Characterization of Essential Oils from *Drimys angustifolia* Miens (Winteraceae) and Antibacterial Activity of their Major Compounds. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 1, p. 164–170, 2013.

SARAIVA, A. M. **Avaliação da atividade biológica de extratos metanólicos de *Schinopsis brasiliensis* Engl. em sistemas microemulsionados.** [s.l.] Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas; Universidade Federal de Pernambuco, 2012.

SILVA, A. F.. **Identificação morfoanatômica e código de barras genético de *Hyptis stricta* BENTH. (Lamiaceae).** [s.l.] Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas; Universidade Federal do Paraná, 2012.

SILVA, A. R. A. DA et al. Healthcare associated infections caused by coagulase-negative Staphylococci in a neonatal intensive care unit. **Rev Bras Ter Intensiva.**, v. 25, n. 3, p. 239–244, 2013.

SILVA, M. S. DA et al. Plantas medicinais usadas nos distúrbios do trato gastrointestinal no povoado Colônia Treze, Lagarto, SE, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 4, p. 815–829, 2006.

SILVA, W. J. DA. **ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE PLANTAS EXISTENTES NO ESTADO DE SERGIPE CONTRA *Aedes aegypti* Linn.** [s.l.] Dissertação de Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente; Universidade Federal de Sergipe, 2006.

SILVA, R. L. et al. Efeito do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* sobre a proliferação de hepatócitos após hepatectomia parcial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. Suplemento 3, p. 101–105, 2002.

SILVA, W. J. et al. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3251–3255, 2008.

SOCIETY, A. C. **CANCER FACTS & FIGURES**. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acs-pc-031941.pdf>>. Acesso em: 22 maio. 2015.

STEFFENELLO-DURIGON, G. **LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA: AVALIAÇÃO RETROSPECTIVA DOS CASOS DIAGNOSTICADOS E TRATADOS PELO SERVIÇO DE HEMATOLOGIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA ENTRE 2001 E 2013.** [s.l.] Dissertação de Mestrado em Farmácia; Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

TCHOUMBOUGNANG, F. et al. Aromatic plants of tropical Central Africa. XLVIII. Comparative study of the essential oils of four *Hyptis* species from Cameroon: *H. lanceolata* Poit., *H. pectinata* (L.) Poit., *H. spicigera* Lam. and *H. suaveolens* Poit. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, p. 340–343, 2005.

VIGNERON, M. et al. Antimalarial remedies in French Guiana: A knowledge attitudes and practices study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 351–360, 2005.

WEBER-SOBRINHO, C. R. **DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE EXTRATOS DA CASCA DO CAULE DE *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. Cebil (Griseb.) Von Reis Alt. (ANGICO-DE-CAROÇO).** [s.l.] Dissertação de Mestrado em Patologia; Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

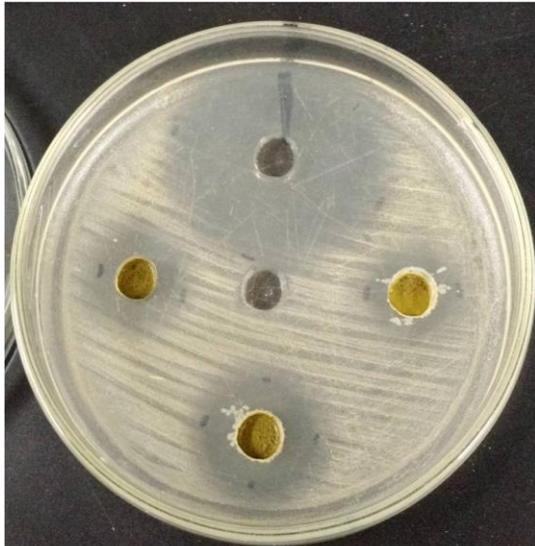
YIGIT, H. et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing b-Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151–1161, 2001.

APÊNDICE

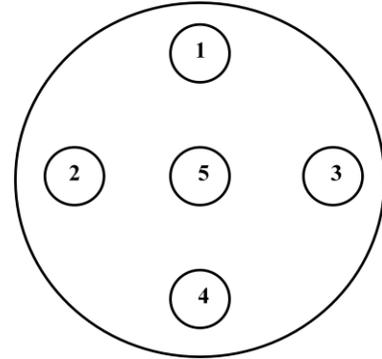
1. APÊNDICE – IMAGENS DOS ENSAIOS ANTIMICROBIANOS REALIZADOS

1.1. Imagens do estudo de atividade antimicrobiana do extrato hexânico das folhas de *Hyptis pectinata* (ExtHex-Hp) frente bactérias de interesse clínico.

FOTO 1.



Hyptis pectinata L. Poit
Extrato Hexânico
Staphylococcus aureus AM 103

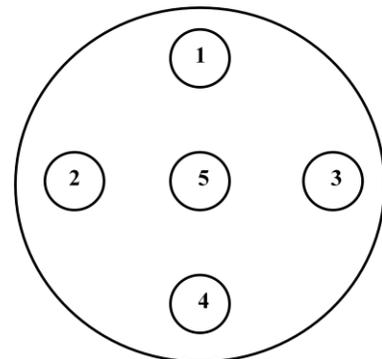


1	Tetraciclina 30µg/poço
2	ExtHex-Hp 5 mg/poço
3	ExtHex-Hp 2,5 mg/poço
4	ExtHex-Hp 10 mg/poço
5	Controle DMSO a 20%

FOTO 2.



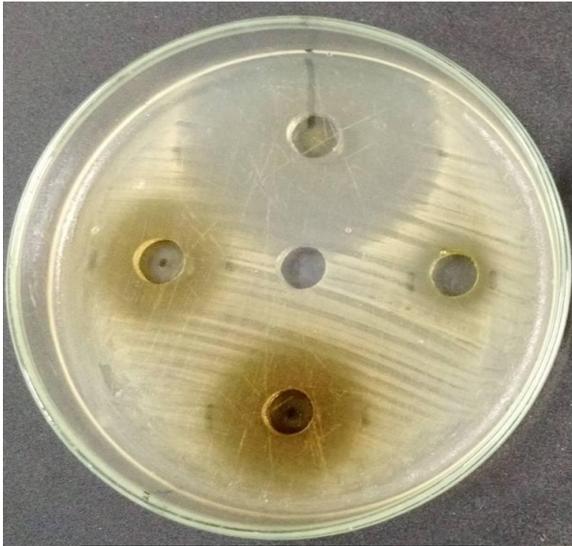
Hyptis pectinata L. Poit
Extrato Hexânico
Staphylococcus coagulase negativo AM 1162



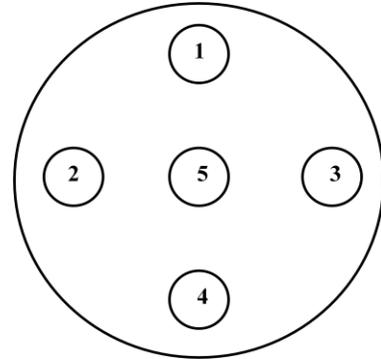
1	Tetraciclina 30µg/poço
2	ExtHex-Hp 5 mg/poço
3	ExtHex-Hp 2,5 mg/poço
4	ExtHex-Hp 10 mg/poço
5	Controle DMSO a 20%

1.2. Imagens do estudo de atividade antimicrobiana do extrato acetato de etila das folhas de *Hyptis pectinata* (ExtAcOEt-Hp) frente bactérias de interesse clínico.

FOTO 3.

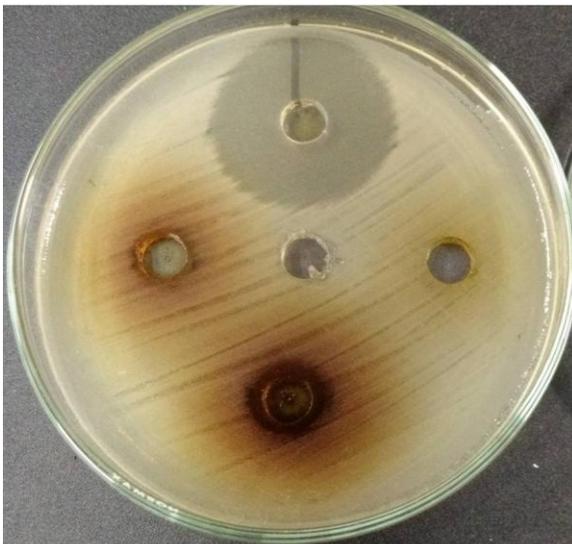


Hyptis pectinata L. Poit
Extrato Ac. de Etila
Staphylococcus aureus AM 103

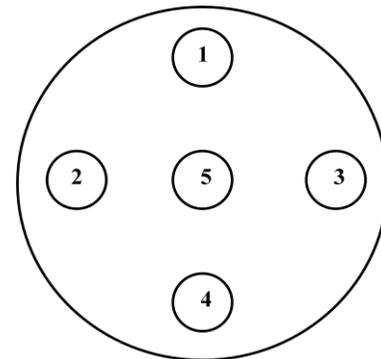


1	Tetraciclina 30 μ g/poço
2	ExtAcOEt-Hp 5 mg/poço
3	ExtAcOEt-Hp 2,5 mg/poço
4	ExtAcOEt-Hp 10 mg/poço
5	Controle DMSO a 20%

FOTO 4.



Hyptis pectinata L. Poit
Extrato Acetato de Etila
Salmonella sp. AM 1282



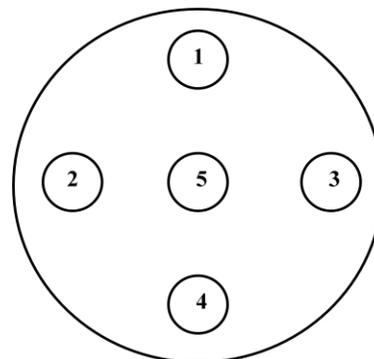
1	Ceftriaxona 30 μ g/poço
2	ExtAcOEt-Hp 5 mg/poço
3	ExtAcOEt-Hp 2,5 mg/poço
4	ExtAcOEt-Hp 10 mg/poço
5	Controle DMSO a 20%

1.3. Imagens do estudo de atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de *Hyptis pectinata* (ExtEtOH-*Hp*) frente bactérias de interesse clínico.

FOTO 5.

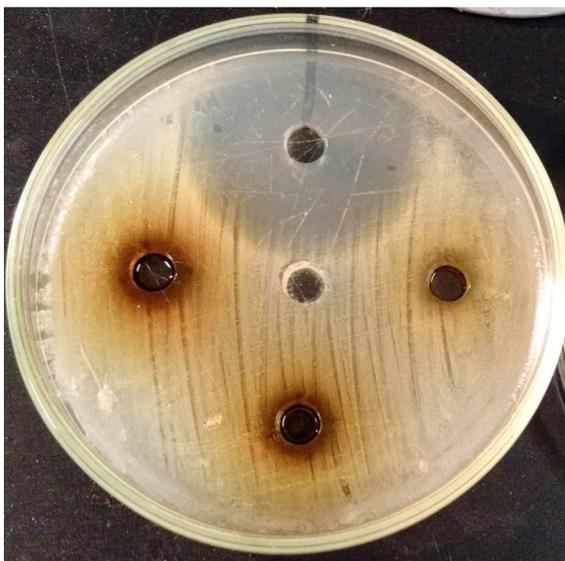


Hyptis pectinata L. Poit
Extrato Etanólico
Micrococcus luteus AM 1200

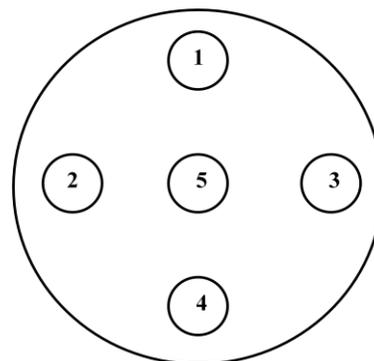


1	Tetraciclina 30 μ g/poço
2	ExtEtOH- <i>Hp</i> 5 mg/poço
3	ExtEtOH- <i>Hp</i> 2,5 mg/poço
4	ExtEtOH- <i>Hp</i> 10 mg/poço
5	Controle DMSO a 20%

FOTO 6.



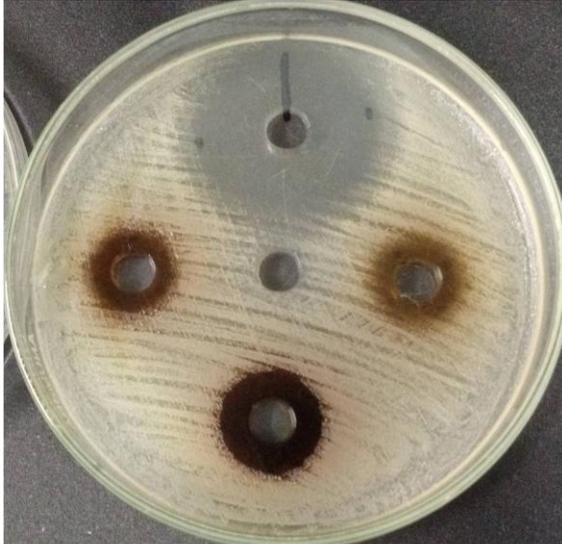
Hyptis pectinata L. Poit
Extrato Etanólico
Staphylococcus aureus AM 103



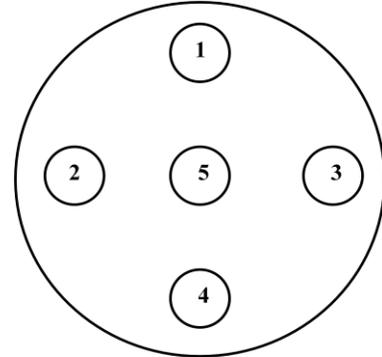
1	Tetraciclina 30 μ g/poço
2	ExtEtOH- <i>Hp</i> 5 mg/poço
3	ExtEtOH- <i>Hp</i> 2,5 mg/poço
4	ExtEtOH- <i>Hp</i> 10 mg/poço
5	Controle DMSO a 20%

1.4. Imagens do estudo de atividade antimicrobiana do extrato aquoso das folhas de *Hyptis pectinata* (ExtAq-Hp) frente bactérias de interesse clínico.

FOTO 7.

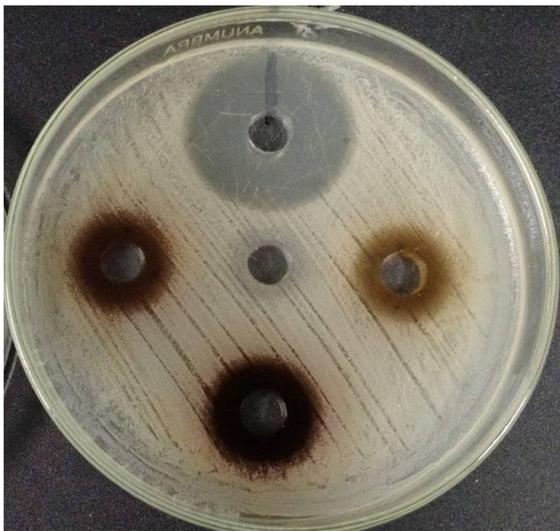


Hyptis pectinata L. Poit
Extrato Aquoso
Staphylococcus coagulase negativo AM 1162

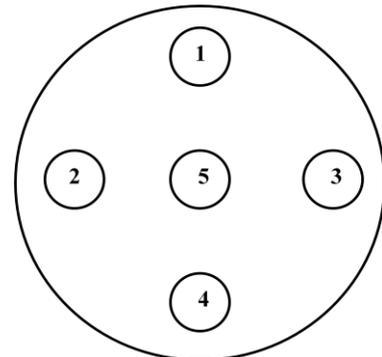


1	Tetraciclina 30 μ g/poço
2	ExtAq-Hp 5 mg/poço
3	ExtAq-Hp 2,5 mg/poço
4	ExtAq-Hp 10 mg/poço
5	Controle DMSO a 20%

FOTO 8.



Hyptis pectinata L. Poit
Extrato Aquoso
Salmonella enterica AM 1280



1	Ceftriaxona 30 μ g/poço
2	ExtAcOEt-Hp 5 mg/poço
3	ExtAcOEt-Hp 2,5 mg/poço
4	ExtAcOEt-Hp 10 mg/poço
5	Controle DMSO a 20%