

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Lippia gracillis Shauer

VALDELUCIA OLIVEIRA CAVALCANTI

RECIFE, 2006.

VALDELUCIA OLIVEIRA CAVALCANTI

ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Lippia gracillis Shauer

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas na Área de Produtos Naturais.

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. EULÁLIA CAMELO PESSOA DE
AZEVEDO XIMENES
RECIFE, 2006.

Cavalcanti, Valdelúcia Oliveira

Atividade antimicobacteriana do óleo essencial de *Lippia gracillis* Shauer /
Valdelucia Oliveira Cavalcanti. _ Recife: A Autora, 2006.

61 folhas: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS

1.Óleo Essencial 2.Lippia gracillis 3.Mycobacterium tuberculosis I.Título

615.12

615.1

CDU (2.ed.)

CDD (22.ed.)

CCB – 2006 – 068

UFPE



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

Recife, 30 de Agosto de 2006.

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 30 de Agosto de 2006 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Profa. Dra. Eulália C.P.A. Ximenes (**Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco**).

Assinatura: Eulália C.P.A. Ximenes

EXAMINADOR INTERNO: Profa Dra. Maria do Carmo Alves de Lima (**Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco**).

Assinatura: Maria do Carmo Alves de Lima

EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Mônica C.P.A. Albuquerque (**Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco**)

Assinatura: Mônica C.P.A. Albuquerque

EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Ester Ribeiro Gouveia (**Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco**)

Ester Ribeiro Gouveia

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

REITOR

Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Celso Pinto de Melo

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

José Thadeu Pinheiro

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Jane Sheila Higino

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Samuel Daniel de Sousa

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

Miracy Muniz de Albuquerque

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

Pedro José Rolim Neto

*Dedico aos meus pais,
Maria José Alves de Oliveira e
José Alves de Oliveira, in memoriam, com carinho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus nosso mentor supremo, que em algum momento de sua magnitude desejou, proporcionar estes momentos de felicidade, amor e ciência a minha pequena sabedoria.

Ao meu companheiro de caminhada e esposo, que sempre esteve ao meu lado nos momentos de alegria e de angústia, pelo incentivo e amor. Aos meus filhos Renata e Guilherme pelo carinho, atenção e toque de jovialidade.

Aos professores pelos ensinamentos e paciência, Professor Haroudo Sátiro e a singular amiga e orientadora Professora Eulália Ximenes, com quem tive o prazer de conviver com alegria, pelos ensinamentos, companheirismo durante todo processo.

Ao Prof. Marcelino Cristiano Júnior do Departamento de Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela atenção e gentileza de ceder o óleo para este estudo.

Aos Amigos do Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN), Madileuza Neves, Fábio Cândido, Ana Albertina, Anésia Siqueira, Tânia Catão, Jesuita Bezerra, Goretti Varejão, Geruza Sousa, Deize Matos, Clenildo do Espírito Santo, Rosa Palmeira, Maria Josefa de Almeida. Aos companheiros do Laboratório do Município do Recife “Prof. Oswaldo Lima Sobrinho” Ana Cristina Reis, Tereza Sales, Betânia Bispo, Marli Valença, Frinéia Vaz, Rodrigo Ximenes, Domitila Verônica. A prestativa Camila Sihler da Vigilância Epidemiológica do Estado de Pernambuco, pelos dados epidemiológicos, enfim a todos que compartilham comigo, as tarefas diárias profissionais, e que de forma direta ou indireta, sem exceção, me apoiaram.

A duas amigas, que sempre me fazem acreditar que podemos ser melhores a cada dia, Ângela Figuerôa e Lúcia Filizola.

Aos colegas do mestrado pela dedicação e cumplicidade: Laurimar, Jovita Braga, Janína Melo.

As amigas e Secretárias do Mestrado Iguacy Duque, e Maria da Conceição Barros de Sousa, pela dedicação e sobretudo pela amizade.

Ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE, pela oportunidade de realizar este mestrado.

A Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco, e a Secretaria de Saúde Município do Recife pela disponibilização das instalações físicas dos laboratórios que acolheram este estudo.

Agradeço a todos enfim, que mesmo quando não perceberam, com palavras gestos e atitudes, incentivaram esta pesquisa.

Que a ciência possa gerar cada vez mais dúvidas e incertezas, para que a cada trabalho, tenhamos novas perguntas e que a cada pergunta possamos ter nova resposta.

*Eles não sabem, nem sonham,
que o sonho comanda a vida,
que sempre que um homem sonha
o mundo pula e avança
como bola colorida
entre as mãos de uma criança.*

Antônio de Gedeão

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - <i>Lippia gracillis</i> Shauer	12
FIGURA 2 - Estrutura Química Timol e Carvacrol	13
FIGURA 3 - Parede Celular das Micobactérias	17
FIGURA 4 - Sistema de Clevenger	24
FIGURA 5 - Teste de Sensibilidade-indireto em Cultura de Lowenstein-Jansen com drogas clássicas..	30
FIGURA 6 - Teste de Sensibilidade-indireto em Cultura de Lowenstein-Janssem com Incorporação do Óleo Essencial de <i>Lippia gracillis</i> Shauer.	31
FIGURA 7 - <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em aumento de 1000X	33
FIGURA 8 - Cultura de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em meio de Lowenstein-Jansen.	34
FIGURA 9 - Teste de Inibição de Crescimento em Presença de PNB	35
FIGURA 10 - Teste de Crescimento em Presença de TCH	35
FIGURA 11 - Teste de Acúmulo de Niacina	35
FIGURA 12 - Teste de Redução de Nitrato a Nitrito	35
FIGURA 13 - Teste de Catalase Termoestável	36

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 -Concentrações crítica das drogas empregadas no teste de sensibilidade do *Mycobaterium tuberculosis* e proporção crítica de mutantes resistentes. 28
- TABELA 2 -Preparação das soluções e diluições das drogas para incorporação no meio de Lowenstein-Jansen. 28
- TABELA 3 -Comparação de atividade antimicobacteriana do óleo essencial de *Lippia gracillis* com as drogas tuberculostáticas. 37

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

α - Alfa

β - Beta

°C - Graus Celsius

mg - miligrama

mL - Mililitro

mm - Milímetro

pH - Potencial hidrogeniônico.

UFC - Unidade Formadora de Colônia

UI - Unidade Internacional

μ g - Micrograma

v/v - volume/volume

PMR - população de mutante resistente.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Figura	i
Lista de Tabela	ii
Lista Siglas e Símbolos	iii
Sumário	iv
Resumo	v
Abstract	vi
1. Introdução	8
1.2 Objetivos	10
2 Revisão da literatura	11
2.1 Gênero <i>Lippia</i>	11
2.2 <i>Lippia gracillis</i> Shauer	12
2.3 Óleo essencial de <i>Lippia gracillis</i>	13
3. Micobactérias	14
3.1 Micobactérias Definição e Classificação	14
3.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15
3.3 Identificação da Espécie	16
3.4 Resistência às Drogas	18
3.5 Diagnóstico da Tuberculose na Doença Pulmonar Ativa	18
4. Tratamento	20
5. Material e Métodos	23
5.1 Material Vegetal	23
5.2 Extração do Óleo Essencial	23
5.3 Microrganismos	24
5.4 Diagnóstico Microbiológico	25
5.4.1 Baciloscopia	25
5.4.2 Descontaminação das Amostras	26
5.4.3 Isolamento do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	26
5.4.4 Identificação do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	27
6 Teste de Sensibilidade	27
6.1 Padronização do Inoculo	29
6.2 Critérios para Interpretação dos Resultados	32

7. Resultados	33
7.1 Identificação – Baciloscopia	33
7.2 Isolamento	v
7.3 Identificação da Espécie	34
7.4 Sensibilidade do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> às drogas e ao óleo essencial de <i>Lippia gracillis</i> Shauer.	36
8 Discussão	38
9 Conclusões	40
10 Perspectivas	41
Referências	42
Anexos	49

RESUMO

Lippia gracillis Shauer, Verbenaceae, é um arbusto com pequenas folhas aromáticas, encontrado em regiões semi-áridas do Nordeste do Brasil. É conhecida popularmente como alecrim de tabuleiro e usada no tratamento de infecções da boca, garganta e pele. Algumas espécies do gênero contêm em sua composição química o timol e carvacrol, compostos majoritários de reconhecida atividade antimicrobiana. Esta pesquisa objetivou o estudo da atividade tuberculostática do óleo essencial de *Lippia gracillis* Shauer frente a cepas selvagens de *Mycobacterium tuberculosis*, e uma cepa padrão de referência H₃₇Rv. Estas cepas foram isoladas e identificadas como *Mycobacterium tuberculosis*, a partir de escarro de pacientes com sinais e sintomas de tuberculose pulmonar, que demonstraram diferentes perfis de sensibilidade aos tuberculostáticos clássicos, pirazinamida, isoniazida, etambutol, rifampicina, etionamida e estreptomicina. A extração do óleo essencial das folhas da planta foi realizada por hidrodestilação com aparelho de Clevenger adaptado. A sensibilidade do *Mycobacterium tuberculosis* aos tuberculostáticos e ao óleo essencial de *Lippia gracillis* foi realizado pelo método das proporções teste indireto e determinação da concentração inibitória mínima. Das quinze cepas estudadas, treze mostraram-se sensíveis ao óleo essencial de *Lippia gracillis* Shauer. Embora resistentes a isoniazida as cepas de *Mycobacterium tuberculosis* LC01, LC 02 e LC07 mostraram-se sensíveis ao óleo essencial de *Lippia gracillis*. Apenas duas cepas LC04 e LC12, que tiveram perfil de resistência a pelo menos três drogas tuberculostáticas, demonstraram também resistência ao óleo essencial. O óleo essencial de *Lippia gracillis* apresentou atividade tuberculostática frente a cepas sensíveis aos tuberculostáticos clássicos, frente a cepas com resistência isoniazida, isoniazida e rifampicina, não demonstrou atividade frente a cepas com três ou mais resistência a diferentes classes de tuberculostáticos.

Palavras chave: Óleo essencial; *Lippia gracillis*; *Mycobacterium tuberculosis*.

ABSTRACT

Lippia gracillis Shauer, Verbenaceae, is a shrub with small aromatic leaves, which is found in the semi arid regions of the northeast of Brazil. It is popular known as “alecrim da chapada”, and it is used in mouth, throat and skin infections treatment. Some species of the kind contain in its chemical content thymol and carvacrol, majority content of known anti microbiological activity. This research had as purpose the study of the mycobacterial activity of the *Lippia gracillis* Shauer essential oil over the fourteen strains, a H₃₇Rv reference. These strains were isolated and identified as *Mycobacterium tuberculosis*, from the smear of patients with signals and symptoms of lung tuberculosis, that showed different sensibility profiles of classical drugs used in the tuberculosis treatment. The extraction of the essential oil from the leaves of the plants was performed by hydro distillation with adapted Clevenger device. For the detection of the *Mycobacterium tuberculosis* strains resistance to the oil and to the pyrazinamide, isoniazid, ethambutol, rifampicin, ethionamide, streptomycin drugs was used the method of indirect test proportion, reported by the World Health Organization. Concomitantly the proportion determination of the resistant mutants was identified the minimum inhibitory concentration of this oil. From the fifteen strains studied thirteen showed to be sensible to the *Lippia gracillis* Shauer essential oil. Although isoniazide resistant to the LC01, LC 02 and LC07 *Mycobacterium tuberculosis* showed sensible to the *Lippia gracillis* essential oil. Only two strains, the LC04 and LC12, that had profile resistance to at least three anti tuberculoses drugs, showed also resistance to the essential oil.

Keywords: Essential oil; *Lippia gracillis*; *Mycobacterium tuberculosis*.

1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade Brasileira e o conhecimento etno-farmacológico colocam o país em uma posição estratégica para explorar racionalmente novas moléculas biologicamente ativas. A extensão do Brasil abrange uma vasta amplitude de climas, solos e altitudes o que favorece a seleção e adaptação dos vegetais nestes sítios. A diversidade química também é dirigida por estes fatores cuja flora se adapta aos estresses abióticos, fauna e microrganismos que coexistem com elas (FERRO, FUNARI, 2005).

A falta de novas opções terapêuticas ou tratamentos mais adequados para as doenças classificadas como negligenciadas, como a tuberculose, é o resultado de falhas no mercado e políticas públicas. A Organização Mundial de Saúde estima que um terço da população mundial esteja infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (WHO, 2005).

No Brasil estima-se a ocorrência de 90.000 casos novos a cada ano com taxa anual de cerca de 50 por 100.000 habitantes e o número de óbitos registrados como causa básica a tuberculose esta em torno de 5.000 por ano (SINAN, 2006).

Em Pernambuco, foram notificados 4.361 novos casos de tuberculose, apresentando um coeficiente de incidência de 51,8 por 100.000 habitantes e especificamente na forma pulmonar 3955 novos casos (SINAN, 2005). Apesar dos avanços no conhecimento das bases moleculares e celulares desta patogenia, o desenvolvimento de novas drogas no combate a esta doença é lento. A quimioterapia utilizada no Brasil é realizada com uma associação de drogas durante seis meses que inclui rifampicina, isoniazida e pirazinamida durante dois meses, seguidos de rifampicina e isoniazida durante os próximos quatro meses. O tempo de tratamento é demasiadamente longo para garantir taxas elevadas de aderência (BLUMBERG, 2003) e há relevante toxicidade, podendo levar a complicações e abandono ao tratamento que pode resultar em seleção de bacilos resistentes às drogas e frequentemente à multidroga resistência. (DENKIN, MARTINS, ZANG 2006). O aumento da emergência da tuberculose resistente às drogas e a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), que compromete as defesas do indivíduo e permite a reativação da infecção ou expõe indivíduos mais susceptíveis à tuberculose, é um desafio

adicional para o controle efetivo da doença (COBERT et al. 2003; NACHEGA, CHAISON, 2003). A descoberta de novas drogas mais ativas, menos tóxicas e que diminua o tempo de tratamento é urgente e objeto de pesquisa em todo mundo (DENK, 2005, 2006, PALACI et al. 2004, ZHANG, 2006). Entretanto nos últimos 40 anos não houve desenvolvimento de uma nova classe de droga.

O gênero *Lippia* é tradicionalmente utilizado no tratamento de desordens gastrintestinal, respiratória e cutânea. Algumas espécies como *Lippia oregnoides*, e *Lippia sidoides* têm mostrado atividade frente a bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia marcescens* e *Candida albicans* (PESSOA, 2005; SANTOS, 2004).

No presente estudo foi investigado o poder bactericida e/ou bacteriostático do óleo essencial de *Lippia gracillis* Shauer, frente ao *Mycobacterium tuberculosis*.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 GERAL

Determinar a atividade antimicobacteriana do óleo essencial de *Lippia gracillis* Shauer frente a cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

1.2.2 ESPECÍFICOS

Isolar e identificar o *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de escarro de pacientes com quadro clínico de tuberculose pulmonar.

Determinar o perfil de sensibilidade ou resistência das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isolados aos quimioterápicos: rifampicina, isoniazida, etambutol, pirazinamida, estreptomicina e etionamida,

Determinar o perfil de sensibilidade ou resistência das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* ao óleo essencial de *Lippia gracillis* Shauer.

Determinar o percentual de mutantes resistentes ao óleo essencial de *Lippia gracillis* através do método das proporções-teste indireto.

Comparar os resultados dos perfis resistência / sensibilidade das cepas, frente ao óleo essencial de *Lippia gracillis* e aos quimioterápicos.

Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de *Lippia gracillis* frente a cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GÊNERO *Lippia*.

A família Verbenaceae Juss. abrange cem gêneros distribuídos em regiões tropical e subtropical de todo o mundo. O gênero *Lippia* Houst, cujo nome deriva de August Lippi, um botânico italiano, é composto de cerca de duzentas espécies representadas por ervas, arbustos e pequenas árvores que são frequentemente aromáticas e distribuídas nas Américas Central e do Sul e territórios da África Tropical (TERBLANCHÉ, KORNELIUS, 1996). É tradicionalmente utilizado no tratamento de infecções gastrointestinais, respiratórias e cutâneas. Em geral, o gênero apresenta composição química consistente com alguns compostos que são encontrados em várias espécies, com atividades farmacológicas antimalárica, anti-viral e citostática (ABAD et al., 1995; GASGET et al, 1993; LOPEZ et al. 1997, PASCUAL et al. 2000). Em muitos casos, as partes usadas são as folhas, e flores, são comumente preparadas em infusão ou decocção, e administradas oralmente ou através de emplastos e lavagens de ferimentos (LORENZI, 2002; PASCUAL et al. 2001).

Algumas espécies têm mostrado atividade antimicrobiana como *Lippia organoides* frente a bactérias como *Staphylococcus aureus* metilino resistente e *Lippia sidóides* contra *Echerichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonela enteritidis*, *Serratia marcescens*, *Candida albicans*, *Mycobacterium smegmatis* e fungos (GIRÓN et al, 1991; LEMOS, 1992; MORTON, 1981; O'BRIEN et al 1987; SANTOS, 2004).

Lippia citriodora e *Lippia graveolens* são utilizadas em preparação alimentares e também como estimulador de apetite (MORTON, 1981; PASCUAL, 2001).

Entre espécies deste gênero algumas estão bem documentadas como a *Lippia citriodora*, devido ao poder aromático do seu óleo essencial usado em perfumaria; *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown que tem grande potencial aromático, com poderosa propriedade anti-oxidante semelhante à vitamina E e a *Lippia dulcis* Trevir com grande potencial adoçante de seu componente (+)-hernandulcin (PASCUAL, 2001).

2.2 *Lippia gracillis* Shauer

O nordeste brasileiro é um celeiro de biodiversidade, com várias espécies espalhadas em vários ecossistemas. A caatinga é o principal bioma da região nordeste, estendendo-se pelo domínio do clima semi-árido. A *Lippia gracillis* é uma dessas espécies, própria da região semi-árida do nordeste do Brasil, de terrenos bem drenados, sendo comum sua presença nos estados de Piauí, Bahia, Ceará, Paraíba e Pernambuco. É popularmente denominada de alecrim de tabuleiro, alecrim da chapada e apresenta uma variedade *Lippia aff. gracillis* com composição química e uso medicinal semelhante (LORENZI, 2002; MATOS, 2002, 1999).

A *Lippia gracillis* Shauer é um arbusto que pode atingir até 2 metros de altura, bem ramificada, caule quebradiço, com folhas pequenas, aromáticas e picantes, simples, cartáceas, com nervação impressa bem visível, de pouco mais que um centímetro de comprimento. Flores miudas amarelo-esbranquiçadas, reunidas em espigas de eixo curto. Frutos do tipo aquênio extremamente pequenos, cujas sementes raramente germinam. (FIGURA 1).

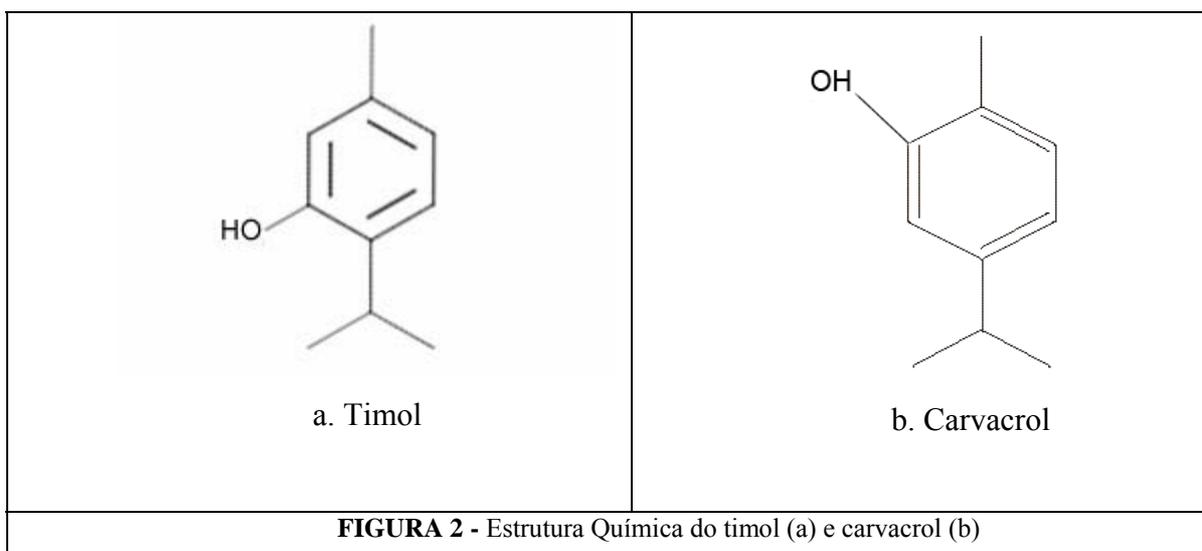


FIGURA 1 - *Lippia gracillis* Shauer. Lorenzi, 2002.

2.3 ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia gracillis* Shauer

Os óleos essenciais são produtos extraídos de várias partes das plantas, são odoríferos, voláteis e lipófilos, são instáveis a presença de luz, calor e umidade. A atividade antimicrobiana de uma variedade de óleos essenciais está bem documentada, particularmente aqueles que contêm concentração relativamente alta de compostos antibacterianos como timol e carvacrol (KUNLE, 2003, LEMOS, 1990). Ensaios antimicrobianos com este óleo mostraram forte atividade frente a bactérias Gram negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella spp.* *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia* e Gram positivas *Staphylococcus*, *Streptococcus*, fungos *Saccharomyces* e *Trichophyton* (MATOS, 1996, 1999; PESSOA et al. 2005).

A composição química do óleo essencial da *Lippia gracillis* reportada na literatura, mostra flutuações quantitativas dos componentes majoritários, provavelmente devido a condições genéticas, não padronização de cultivo e clima. Em três estudos realizados demonstraram as seguintes variações na composição dos componentes majoritários do óleo: carvacrol 47,8%, 11,8%, 54,4%; o timol 4,8%; 30,6% , 1,9% e o ρ -cimeno 19,2%, 10,7% e 10,7% (LEMOS, 1992; MATOS, 1999; PESSOA, 2005). As propriedades farmacológicas antimicrobianas, provavelmente devem-se ao fato de possuir dentre outros compostos, os terpenos timol e o carvacrol (Figura 2).



O carvacrol cuja nomenclatura química é 2-metil-5-(1-metil- etil) fenol (C₄H₁₄O) é isômero de posição do timol, possui características químicas e atividades semelhantes. Possui um aroma forte e irritante. Este composto possui propriedades antimicrobianas, antiinflamatórias, anti-oxidantes (NOSTRO et al. 2004; LAMBERT et al. 2001).

O timol de nomenclatura química 5-metil-2-(1-etil) fenol (C₁₀H₁₄O), é uma substância química presente no óleo essencial de várias plantas do gênero *Thymus*, *Occimum* e *Lippia* tem aroma forte e irritante. É utilizado como princípio ativo de formulações anti-sépticas, para o tratamento de infecções na boca, garganta e pele (GRANGE, 1996).

3 MICOBACTÉRIAS

3.1 DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

As micobactérias são taxonomicamente descritas no gênero *Mycobacterium*, único na família Micobacteriaceae, pertencente à ordem Actinomycetales. O gênero *Mycobacterium* compreende cem espécies, vinte e cinco identificadas como patógenas ao homem e uma diversidade de espécies, de grande distribuição na natureza. São bactérias aeróbias, em forma de bacilos retos ou ligeiramente curvos com dimensões que variam de 0,2 a 0,6 µm por 1 a 10 µm, são imóveis e não formadores de esporos (CORTINAS et al. 2001; KONEMAM, 2001; RASTOGI, 2001; VERONESI, 2005).

Na clínica médica as micobactérias são classificadas em três categorias; as que causam tuberculose humana: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* e *M. micriti*; A segunda categoria compreende as micobactérias cultiváveis *in vitro* designadas de micobactérias atípicas, com várias denominações conhecidas como micobactérias não pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* ou micobactérias patógenas oportunistas. São consideradas comensais ao homem e aos animais e dependendo de certas circunstâncias podem provocar doenças chamadas micobacterioses e na terceira categoria o encontra-se *Mycobacterium leprae* caracterizado pela incapacidade de crescer em meios de cultura artificiais, esta

característica pode ser analisada a luz de dados que indicam marcante redução evolutiva do genoma desta micobactéria (CHERNOCH, 1994; COLL, 2003).

A diversidade existente no gênero *Mycobacterium* é observada através da variabilidade na morfologia, velocidade de crescimento, requerimentos nutricionais e patogenicidade (GRANGE, 1999, VERONESI, 2005).

As bactérias deste gênero têm características especiais como o tempo de geração longo de 3 a 18 horas, em média, para bactérias de crescimento rápido e lento, respectivamente.

Embora não sejam corados com facilidade, uma vez corados com carbofucsina, resistem à descoloração pelo álcool ácido. Esta característica, evidenciada pelo Método de Ziehl-Nelsen, deve-se ao alto teor de lipídios presente na parede, aproximadamente 60% do seu peso seco, e tem grande importância para seu reconhecimento (BOOKS, 2000; KONEMAN, 2001).

Com seu metabolismo voltado especificamente para construção da parede, que o protege dos agentes químicos, *Mycobacterium tuberculosis* cresce lentamente, multiplicando sua população de 18 a 48 horas, dependendo da oferta de oxigênio, pH do meio, e do acesso aos nutrientes. Entretanto são facilmente destruídos por agentes físicos como o calor, os raios ultravioletas da luz solar e radiações ionizantes. *Mycobacterium tuberculosis* não se apresenta livre na natureza e depende do parasitismo (VERONESI, 2005).

3.2 *Mycobacterium tuberculosis*

O microrganismo causador da tuberculose o *Mycobacterium tuberculosis* foi descrito em 1882, por Robert Koch que isolou, descreveu, cultivou e reproduziu a patologia em animais de laboratório. Esta descoberta lhe valeu o prêmio Nobel de medicina em 1905. Os bacilos que causam a tuberculose estão agrupados no complexo *Mycobacterium tuberculosis*, composto por: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium microti*. Estudos de hibridização DNA-DNA, sequenciamento de 16SrDNA, das seqüências intergênicas 16S-23S, evidenciam que os membros deste complexo constituem de fato uma única espécie *Mycobacterium tuberculosis* (BRENNAN, 1991; VERONESI, 2005).

3.3 IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* pertence ao grupo de micobactérias de crescimento lento, o qual é caracterizado pelo crescimento de colônias não pigmentadas, rugosas, após 20 a 28 dias de incubação a 37°C, em meio Lowenstein-Jansen ou Middlebrook. A diferenciação entre os componentes deste complexo pode ser realizada fenotipicamente com provas de acúmulo de niacina, redução de nitritos a nitrato pela ação nitrorredutase, de catalase termoestável à 68° C, presença da pirazinamidase e crescimento em presença da hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico. (BRASIL, 1994; CANETTI, 1963).

Várias espécies de micobactérias diferentes do *Mycobacterium tuberculosis* emergiram como patógenos importantes, com diferentes potenciais de produção de doença e frequentemente com perfis singulares de sensibilidade às drogas tuberculostáticas.

A parede celular da micobactéria é uma estrutura que fornece suporte e proteção para a célula, capaz de induzir hipersensibilidade retardada, bem como resistência à drogas, possuindo mecanismos que permitem a troca de substâncias entre a célula e o meio onde ela se encontra (BROOKS, 2000).

Embora haja semelhança química e estrutural entre as paredes celulares da maioria das bactérias, o comportamento de sua estrutura diante da coloração de Gram, dividiu as espécies em dois grupos: Gram positivas e Gram negativas (DRAPER, 1991, TORTORA, 2003).

As micobactérias são consideradas biologicamente Gram positivas, porém apresentam comportamento irregular diante desta coloração devido a diferentes composições em suas paredes enquanto nas bactérias Gram positivas possuem proteínas e polissacarídeos ligados ao peptidoglicano, nas micobactérias são encontradas predominantemente lipídios (DRAPER, 1991).

A parede celular da micobactéria é formada essencialmente por várias camadas (Figura 3). A camada interna é a membrana plasmática, que é similar a membrana encontrada em outras bactérias, consiste de uma camada bilipídica permeável interagindo com proteínas, que cercam o citoplasma da célula (RASTOGI, 1991). Na segunda camada é encontrada a estrutura peptidoglicana/ arabinoglicana que forma a base estrutural da parede celular. Esta estrutura é uma macromolécula constituída do polímero

peptidoglicano, um oligossacarídeo formado por unidades dissacarídicas de N-acetilglicosamina e ácido N-glicolilmurâmico contendo ligações cruzadas de pequenos peptídeos, e arabinogalactana, um complexo polissacarídeo ramificado. A camada seguinte encontram-se os ácidos micólicos, que são ácidos graxos ramificados de cadeia longa 2-alquil-3-hidroxi, que apresenta variações entre espécies bacterianas (BARROW, 1997).

Na camada mais externa da parede celular micobacteriana é muito variável entre as espécies, com variações na mesma espécie. Contém polissacarídeos, glicopeptídeos, lipopeptídeos, fosfolipídios, sulfolipídeos e outros lipídeos complexos (RASTOGI, 1994).

Os principais componentes das paredes externas são os glicopeptídeos ou micosídeos –C, antígenos sorotipo específicos únicos nas micobactérias, e também compostos estruturalmente semelhantes os glicopeptídeos apolares (MINOR, 1992; ZHANG, 2006).

A camada externa é ainda apontada como indutora de várias respostas ao hospedeiro, e ajuda a proteger a micobactéria dos efeitos danosos do ambiente fagolisossomal do macrófago hospedeiro (BARROW, 1997; DRAPER, 1991; NINIKIN, 1991; RASTOGI, 1991).

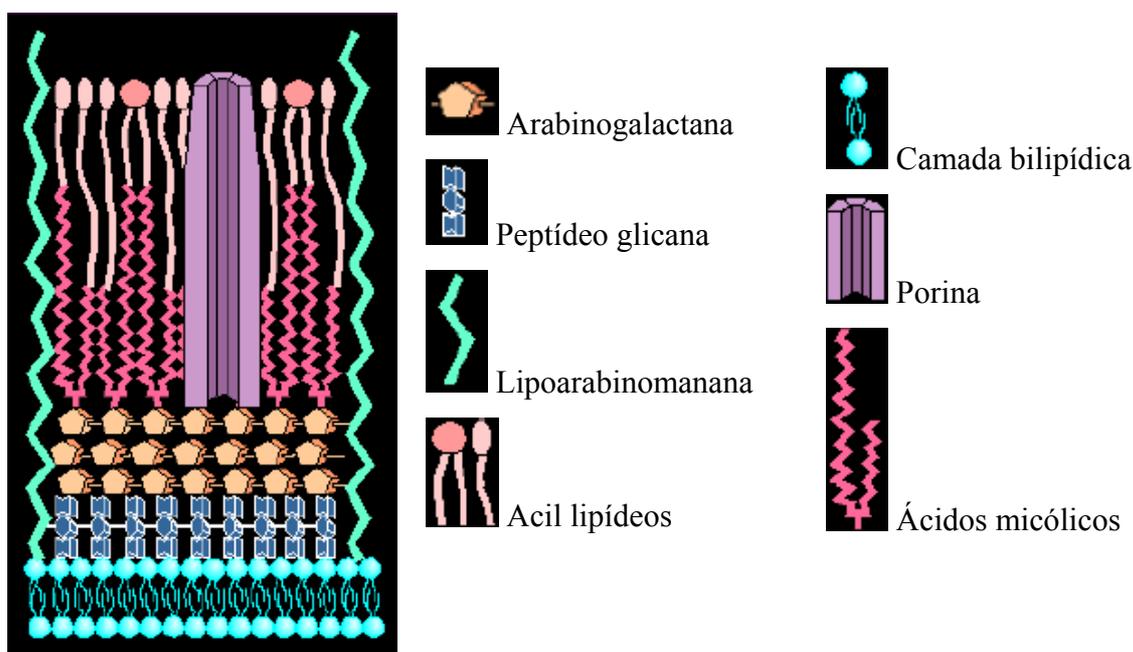


FIGURA 3 - Parede celular micobacteriana. Draper, 1991.

3.4 RESISTÊNCIA ÀS DROGAS

A resistência à droga pelas micobactérias ocorre devido a mutações espontâneas no seu genoma na frequência de 10^5 - 10^8 . Justificando assim a utilização de esquema terapêutico com várias drogas, visando minimizar a seleção de cepas resistentes.

As micobactérias são caracterizadas por um envelope celular altamente hidrofóbico que atua como uma barreira de permeabilidade para muitos componentes e possui um sistema de efluxo de fármacos bem-desenvolvido. As micobactérias também produzem enzimas hidrolíticas ou fármaco-modificadoras como β -lactamases e aminoglicosídeos acetil transferases. Estes estão entre os fatores citados para explicar a resistência natural de muitas espécies de micobactérias aos antibióticos usados frequentemente (DAVID, 1991).

Análises genéticas e moleculares de bacilos resistentes sugerem que a resistência é usualmente adquirida por alterações no alvo do fármaco como consequência de mutações no gene que codifica esse alvo. Durante a exposição do *M. tuberculosis* ao fármaco, existe uma pressão seletiva para mutantes resistentes. As linhagens multi-drogas resistentes surgem após uma seqüência de mutações nos diferentes genes envolvidos com cada um dos fármacos (URIBE, 1985).

3.5 DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR ATIVA

A baciloscopia ou pesquisa direta do bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) consiste na coloração de esfregaço de amostra clínica pelo método de Ziehl-Neelsen (ZN), apesar de possuir baixa sensibilidade, requerendo cerca de 10.000 bacilos por mililitro da amostra para um resultado positivo, é o método largamente utilizado como diagnóstico preliminar de tuberculose e no acompanhamento de pacientes em tratamento por ser simples, eficaz e de baixo custo. O diagnóstico microbiológico da tuberculose objetiva detectar a micobactéria por microscopia ou métodos moleculares. A cultura é o método de isolamento e identificação de micobactérias viáveis. A sensibilidade da cultura é maior do que a da baciloscopia, cerca de 10-100 bactérias por mililitro podem ser detectadas, e

possibilita a realização do teste de sensibilidade às drogas. Entretanto a sensibilidade da cultura pode ser comprometida em pacientes com poucos bacilos (CRAWES, 2003; SEVERO, 1993).

Vários exames auxiliam no diagnóstico da tuberculose como o estudo radiológico convencional torácico; a prova tuberculínica, útil como triagem no diagnóstico para tuberculose, muito embora indique apenas uma infecção o que não é suficiente para o diagnóstico da doença. A técnica do escarro induzido; broncoscopia com lavado brônquio alveolar e ou biópsia transbrônquica; tomografia computadorizada de tórax; novas técnicas de biologia molecular; testes bioquímicos como dosagem da adenosina deaminase (ADA) que podem ser utilizados apenas em investigação da tuberculose pleuropulmonar (BROOKS, 2000, WHO, 2002).

O processo de transmissão das micobactérias presentes em perdigotos se faz através da inalação. A doença resulta da instalação, proliferação dos microrganismos virulentos e da interação com o hospedeiro. A resistência, hipersensibilidade do hospedeiro influencia acentuadamente no desenvolvimento da doença. As partículas contendo 2 a 3 bacilos, alcançam os pulmões onde geralmente são fagocitadas pelos macrófagos alveolares (GOODMAN, 1996; KONEMAN, 2001)

Ocorre então a ativação do macrófago pela presença dos bacilos, que em geral nos indivíduos saudáveis, os destroem. Entretanto se os bacilos não forem destruídos, os fagócitos tendem a protegê-los dos anticorpos e de outras defesas imunes, muitos se multiplicam dentro dos fagócitos. Células imunes se acumulam no sítio da infecção, formando uma camada circundante fechada que recebe o nome de tubérculo, característica que dá a doença seu nome. Os macrófagos liberam enzimas e citosinas que causam uma inflamação lesiva ao pulmão. Após algumas semanas, o interior do tubérculo torna-se caseoso e os bacilos não crescem bem, tornam-se dormentes devido a pouca oferta de oxigênio, estas lesões cicatrizam e calcificam-se, sendo denominadas complexo de Ghon. As lesões caseosas podem evoluir, tornando-se mais líquidas e com cavidade cheia de ar, facilitando a dispersão do bacilo pelo mecanismo da tosse o que favorece a sua propagação (BROOKS , 2000; WHO, 2005).

4 TRATAMENTO

No Brasil, o tratamento da tuberculose é feito através de uma associação de medicamentos bacteriostático e bactericida com objetivo de promover a cura, prevenir o óbito associado a tuberculose e suas complicações, prevenir as recidivas da doença, diminuir a transmissão e bloquear o surgimento de bacilos resistente às drogas (CONSENTINO et al. 1999; ROCHA, VIEIRA, NEVES, 2004).

O tratamento da tuberculose baseia-se em conceitos muito distintos das demais infecções bacterianas. *Mycobacterium tuberculosis* tem um tempo de geração prolongado e a capacidade de entrar em período de latência com atividade metabólica limitada, o que dificulta a ação dos antibióticos (BROOKS, 2000; TORTORA, 2003). Existem populações de bacilos diferentes em função da sua localização e atividade. Os bacilos presente em cavidades pulmonares se multiplicam ativamente em um ambiente aeróbio; os localizados no interior dos macrófagos o fazem em um ambiente microaerófilo que induz a latência e os que se encontram no interior do lesões fechadas, em presença de material caseoso, têm crescimento intermitente (TORTORA, 2003; VERONESI, 2005). A penetração do antibiótico nos tecidos infectados é facilitado pela irrigação ou dificultado pela presença de pus e material caseoso; o pH ácido, encontrado no material caseoso e interior dos macrófagos, condiciona o a atividade dos fármacos. Os fármacos antituberculose apresentam um perfil de atividade diferenciada frente a cada uma destas localizações e populações, o tratamento prescrito deve ser efetivo frente a estas situações (BROOKS, 2000; COLL, 2003; WHO, 2005).

Usualmente a quimioterapia para tuberculose é feita com associação de drogas utilizadas no esquema de primeira linha, isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, por seis meses. Se este tratamento falha por resistência bacteriana a droga ou intolerância por parte do paciente, uma segunda linha de drogas é usada, como para-aminosalicilato, kanamicina, fluorquinolonas, capreomicina, etionamida e cicloserine, que em geral é menos efetiva ou mais tóxica com sérios efeitos colaterais são reservadas como alternativas terapêuticas (BLUNBERG, 2003).

A rifampicina é um antimicrobiano semi-sintético, é um potente inibidor da síntese de RNA mensageiro, e por tanto da transcrição genética. Atua em bacilos metabolicamente

ativos e em latência, tanto em focos necróticos como no interior dos macrófagos, tem efeito bactericida sobre as células do *Mycobacterium tuberculosis*. A rifampicina é o agente anti-micobacteriano mais amplo e ativo sobre todos os grupos em particular em lesões caseosas fechadas nas quais a atividade de replicação pode ser lenta e episódica.

A Pirazinamida, um derivado sintético da nicotinamida, é um pro-fármaco que é convertido em sua forma ativa, ácido pirocinóico, por uma enzima micobacteriana pirazinamidase. É ativa apenas em pH ácido e possui um potente efeito esterilizante sobre os bacilos da tuberculose latentes localizados no interior dos macrófagos, porém tem pouca atividade frente as demais micobactérias, incluindo outros membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (COLL, 2003; PYFYFER, 2000; ZHANG, 2006).

O Etambutol, etileno-diamino-dibutanol é um produto isômero destrógiro do derivado da etilenodiamina, é ativo sobre *Mycobacterium tuberculosis* em crescimento ativo das células susceptíveis. Tem atividade variável sobre as outras micobactérias de crescimento lento. Inibe de forma específica a biossíntese da parede micobacteriana. Assim a resistência ao etambutol se associa com alterações de uma região genômica definida, o operon *embCAB*, que codifica arabinosil transferase (*EmbC*, *EmbA* e *EmbB*, no *Mycobacterium tuberculosis*) relacionadas com a síntese de componentes da parede celular como o arabinogalactano lipoarabinomanana (RASTOGI, 1991; PFYFER, 2000). O etambutol, não é considerado bactericida e não pode ser utilizado isoladamente em tratamentos de curta duração.

A estreptomicina é um aminoglicosídeo que interfere na síntese protéica bloqueando a tradução do RNAm. Estas mutações afetam o gene que codifica o 16sRNAr (*rrs*) e a proteína ribossomal S12 (*rpsL*). A estreptomicina é o mais eficaz para micobactérias extracelular em divisão ativa nas cavidades.

A isoniazida é um fármaco sintético introduzida na terapia em 1952, os membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* são geralmente sensíveis. É um pró-fármaco que requer ativação *in vivo* que produzirá um potente derivado capaz de oxidar ou acilar grupos protéicos, que atuará na síntese de ácido micólico. É ativa contra todos os grupos de micobactérias com divisão rápida e lenta, encontrados no meio ácido dos macrófagos com algum efeito bactericida mesmo em lesões caseosas fechadas (COLL, 2003; TERBLANCHÉ, 1996; ZHANG, POST-MARTINS, DENKIN, 2006).

Etionamida (etil-tio-isonicotinamida) é derivado do ácido nicotínico com potente atividade frente à *Mycobacterium tuberculosis* e outras micobactérias. Inibe a síntese de ácidos micólicos e estimula as reações de óxido redução (COLL, 2003; TERBLANCHÉ, KORNELIUS, 1996; ZHANG, 2006).

As principais razões pela busca de novas drogas antituberculose, é a diminuição no tempo de tratamento, facilitando à adesão por parte do paciente, promoção de tratamento mais efetivo contra a tuberculose latente, efetividade no tratamento de tuberculose causada por bacilos multidroga resistentes.

Cerca de 1200 drogas foram aprovadas para comercialização nos últimos vinte anos, menos que 1% foi voltada para doenças infecciosas que predominam em países em desenvolvimento (TROUILLER, 1999).

Entre as novas drogas candidatas a terapia da tuberculose estão:

As Rifamicinas de longa atividade, que podem promover o espaçamento no tratamento dos bacilos intermitentes diminuindo o número de doses. O mais promissor é a Rifapentina, aprovada para o tratamento nos EUA em 1998. A Rifabutina, que tem impacto menor sobre as enzimas hepáticas, é recomendado para pacientes infectado pelo HIV e tuberculose que não podem receber rifampicina devido a interações com o agente anti-retroviral (COLL, 2003; ZHANG, POST-MARTINS, DENKIN, 2006).

Significante avanço no tratamento da tuberculose tem sido feito com o desenvolvimento de Fluorquinolonas de largo espectro, novos componentes nesta classe como Moxifloxacin e Gatifloxacin que parece ser mais ativos frente à *Mycobacterium tuberculosis* (JACOBS, 1999).

Duas novas classes de componentes são de especial interesse como drogas antituberculose, as oxazolidonas e linezolid. A oxalidona é um antimicrobiano de largo espectro, aparece como substancial atividade anti-micobacteriana, com atuação na síntese protéica. Nesta classe se destaca PNU-100480. A Linezolid tem demonstrado boa atividade frente a *Mycobacterium tuberculosis* em modelo animal.

Os Nitroimidazopiranos, drogas relatadas como nitroimidazoles, com um componente promissor PA-824, com novo mecanismo de ação frente *Mycobacterium tuberculosis* e atividade bactericida comparável a isoniazida, parece ter atividade sobre microrganismo sem replicação, sugerindo potente ação esterilizante, capaz de diminuir significativamente o tratamento da tuberculose (STOVER, 2000).

A recente descoberta da Diarilquinolina, R207910 uma droga promissora, com potente atividade bactericida e concentração inibitória mínima de 0,06µg/mL que demonstra maior atividade bactericida que a isoniazida e rifampicina, diminuindo em pelo menos 1 unidade logarítmica o crescimento bacteriano. A R207910 utilizada em substituição a drogas de primeira linha do regime de tratamento da tuberculose (rifampicina, isoniazida e pirazinamida) em modelo animal, acelerou a atividade bactericida, conduzindo a completa cultura converção com 2 meses de tratamento em algumas combinações. Os níveis plasmáticos associados com eficácia em ratos, foram bem tolerados em voluntários humanos.

A Diarilquinolina é uma droga que atua sobre a ATP Sintetase do *Mycobacterium tuberculosis*, que é a chave para a síntese do ATP e do geração do potencial de membrana (ANDRIES et al, 2004; HANG, POST-MARTINS, DENKIN, 2006).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATERIAL VEGETAL

Amostras de *Lippia gracillis* Shauer foram coletadas na cidade de Ibimirim, Pernambuco. Uma amostra deste espécime foi depositada no Herbarium Professor Dardano de Andrade, Universidade Federal Rural de Pernambuco sob o número 12470.

5.1.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial utilizado neste trabalho foi gentilmente cedido pelo Professor Cristiano Marcelino Júnior do Departamento de Química, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, que realizou a extração por destilação úmida, utilizando um sistema de Clevenger adaptado a um balão de vidro (Figura 4).



Figura 4 Sistema de Clevenger

As folhas secas foram transferidas para um balão de destilação de capacidade de 5L e adicionado um volume de água suficiente para cobrir a massa folhar. O material foi aquecido a 80°C, com o auxílio de manta de aquecimento, até a produção de vapores e extração dos constituintes voláteis das folhas. A mistura óleo/água foi condensada na parte da vidraria que contém uma torneira, formando duas fases. A água foi eliminada, por ser mais densa, e o óleo essencial foi coletado. O óleo obtido foi separado da água, seco pela adição de sulfato de magnésio e armazenado em frasco de vidro âmbar sob refrigeração (CRAVEIRO et al. 1998).

5.2 MICRORGANISMOS

Foram incluídas neste estudo uma cepa de referência *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv e quatorze cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas e identificadas a partir do escarro de pacientes, com quadro clínico de tuberculose pulmonar. O isolamento destes microrganismos foi realizado no Laboratório Municipal do Recife “Professor Oswaldo

Lima Sobrinho” e os testes de sensibilidade aos tuberculostáticos foram realizados no Laboratório Central de Saúde Pública “Dr. Milton Bezerra Sobral” LACEN-PE.

5.3 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

As amostras clínicas foram inicialmente submetidas à baciloscopia pelo método de Ziehl-Neelsen, seguida da descontaminação pelo método de Petroff. As amostras descontaminadas foram semeadas em meio de Lowenstein-Jensen. Após a incubação a temperatura de 37°C durante oito semanas, as culturas foram submetidas ao teste de sensibilidade à rifampicina, estreptomicina, isoniazida, etionamida, etambutol, pirazinamida e ao óleo essencial da *Lippia gracillis* Shauer utilizando o método das proporções-teste indireto (AZIS et al, 2003; BRASIL, 1994; CANETTI, RIST, GROSSET, 1963).

5.31 BACILOSCOPIA

Esfregaços das amostras clínicas (escarro) foram realizados, com posterior fixação em chama e coração pelo método de Ziehl-Neelsen. Após a fixação, a lâmina foi coberta com solução de fucsina fenicada a 0,3% (p/v), em seguida a lâmina foi aquecida até obter três sucessivas emissões de vapores. A fucsina foi eliminada e toda a superfície da lâmina coberta com solução de álcool-ácido. A lâmina foi então lavada e contra-corada com solução de azul de metileno (BRASIL, 1994; WHO, 2003). O esfregaço foi lavado e seco para observação ao microscópio óptico com aumento de 1000X.

5.3.2 DESCONTAMINAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram tratadas a fim de eliminar os microorganismos contaminantes, que por se desenvolverem mais rapidamente que as micobactérias, impedem a multiplicação dessas. O método utilizado para esta finalidade foi o de Petroff cujo procedimento consiste em adicionar a solução de NaOH 1N, em volume correspondente ao mesmo do espécime. O tubo foi agitado periodicamente e incubado a 37°C por um período de 15 a 30 minutos, até uma possível homogeneização. Água destilada foi adicionada no mesmo volume desta preparação, esta etapa foi realizada para reduzir a viscosidade da solução e aumentar a eficácia da centrifugação. O material foi neutralizado por gotejamento com solução de ácido clorídrico a 1N até o aparecimento da cor âmbar. Esta preparação foi centrifugada a 3.000 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado em recipiente a prova de respingos. O sedimento foi semeado em volumes de 0,1 mL em meio de Lowenstein-Jansen (BRASIL, 1994; CANETTI, RIST, GROSSET, 1963, WHO, 2003).

5.3.3 ISOLAMENTO DO *Mycobacterium tuberculosis*

O meio de cultura Lowenstein-Jensen é um meio sólido à base de ovo e contém glicerol e asparagina como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente.

O meio base desidratado foi pesado e dissolvido em água destilada, conforme recomendações do fabricante. Em seguida foi adicionado o glicerol a base e o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C, por 15 minutos. Ovos foram assepticamente limpos e secos, após homogeneização da clara e gema, foram filtrados, adicionado ao meio base recém autoclavado e resfriado. O balão foi agitado suavemente e o meio distribuído em volumes de 4,5 mL em tubos de ensaio com tampas rosqueáveis. Em seguida este meio foi coagulado a temperatura de 80°C por 45 minutos e incubados a 37°C por 24 horas para controle de sua esterilidade.

Uma alíquota de 0,1 mL da amostra de escarro descontaminada foi semeada em meio Lowenstein-Jansen, os tubos foram colocados em posição inclinada, com as tampas

parcialmente fechadas para permitir a absorção do inoculo e incubados a uma temperatura de 37° C por um período de 20 a 28 dias. Controles de crescimento sem droga ou óleo foram semeados paralelamente.

5.3.4 IDENTIFICAÇÃO DO *Mycobacterium tuberculosis*

A identificação do *Mycobacterium tuberculosis* foi realizada de acordo com a velocidade de crescimento, ausência de pigmentação, aspecto da colônia, produção de niacina; crescimento em presença de agentes inibidores como ácido p-nitrobenzóico (PNB 500 µg/mL), hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH 2 µg/mL), (BRASIL, 1994; CANETTI, RIST, GROSSET, 1963; WHO, 2003).

6 TESTE DE SENSIBILIDADE

A sensibilidade das cepas isoladas do *Mycobacterium tuberculosis* às drogas foi avaliada pelo método das proporções-teste indireto, um dos métodos bacteriológicos mais empregados e aceitos pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2003). O método das proporções consiste em detectar a proporção de bacilos resistentes em uma população de *M. tuberculosis*, frente a uma concentração da droga que é capaz de inibir o desenvolvimento das células sensíveis mas não o das resistentes “concentração crítica”. Para cada droga foi definida uma proporção de mutantes resistentes em uma população bacilar, igual ou acima da qual a amostra é considerada resistente “proporção crítica” (Tabela. 1).

As drogas utilizadas, em concentrações críticas, para este teste foram Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida, Estreptomina, Etambutol, Etionamida, e o óleo essencial de *Lippia gracilis* em concentrações que variaram de 5 a 0,009% v/v (RASTOGI et al. 1998). Estas concentrações do óleo essencial foram conseguidas através de diluições seriadas de razão dois do óleo em solução de tween 80 a 1%.

TABELA 1 Concentrações crítica das drogas empregadas no teste de sensibilidade do *Mycobacterium tuberculosis* e proporção crítica de mutantes resistentes.

DROGAS	CONCENTRAÇÕES ($\mu\text{g/mL}$)	PROPORÇÕES (%)
ISONIAZIDA	0,2	1,0
RIFAMPICINA	40,0	1,0
PIRAZINAMIDA	100,0	10,0
ESTREPTOMICINA	4,0	10,0
ETAMBUTOL	2,0	1,0
ETIONAMIDA	20,0	10,0

BRASIL, 1994.

A preparação das soluções e as diluições para incorporação no meio Lowenstein-Jansen estão representados na tabela 2.

As drogas utilizadas no teste de sensibilidade foram incorporadas ao meio de Lowenstein-Jansen, após a esterilização da base e antes da coagulação do mesmo, assim como o óleo essencial.

TABELA 2 Preparação das soluções e das diluições das drogas para incorporação no meio de Lowenstein-Jansen

Droga (Sigma)	Potência (%)	Pesagem (g)	Diluyente (10mL)	Diluições	Volume a ser incorporado em 200mL de Lowenstein-Janssem
Isoniazida	100	0,1	Água destilada	1/100	0,4
Rifampicina	100	0,1	Etileno glicol	-	0,8
Pirazinamida	100	0,1	Água destilada	-	2,0
Estreptomicina	80	0,125	Água destilada	1/10	0,8
Etambutol	100	0,1	Água destilada	1/10	0,4
Etionamida	100	0,1	Etileno glicol	-	0,4

BRASIL, 1994.

6.1 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO BACTERIANO

A partir de um crescimento em meio sólido, foi preparada uma suspensão, utilizando o maior número de colônias para obter uma turvação correspondente ao tubo número 1 da escala de MacFarland que corresponde a 10^8 Unidades Formadoras de Colônia por mL.

A partir desta suspensão padronizada, foram efetuadas diluições decimais até 10^{-6} e semeados 0,1 mL das diluições 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6} nos tubos de meio de cultura controle (sem droga ou óleo). Nos tubos de meio de cultura com drogas (Figura 5) ou óleo (Figura 6) somente foram semeadas as diluições 10^{-3} e 10^{-5} e 10^{-2} , 10^{-3} respectivamente. Estes tubos foram inclinados horizontalmente de forma que o inóculo se distribuiu e foi absorvido sobre toda a superfície do meio e incubados por 24-48 horas. Após este período os tubos foram reincubados na posição vertical a 37° C por 20 dias. Leituras foram realizadas e anotados os resultados do teste quando houve crescimento eugônico nos tubos controle, quando não houve crescimento nos tubos-controle de PZA, eles foram reincubados e realizadas nova leitura com 28 dias.

Tubos contendo meio Lowenstein-Jansen adicionado de PNB e de TCH foram utilizados se como agentes inibidores de crescimento para auxiliar no diagnóstico da espécie de *Mycobacterium*.

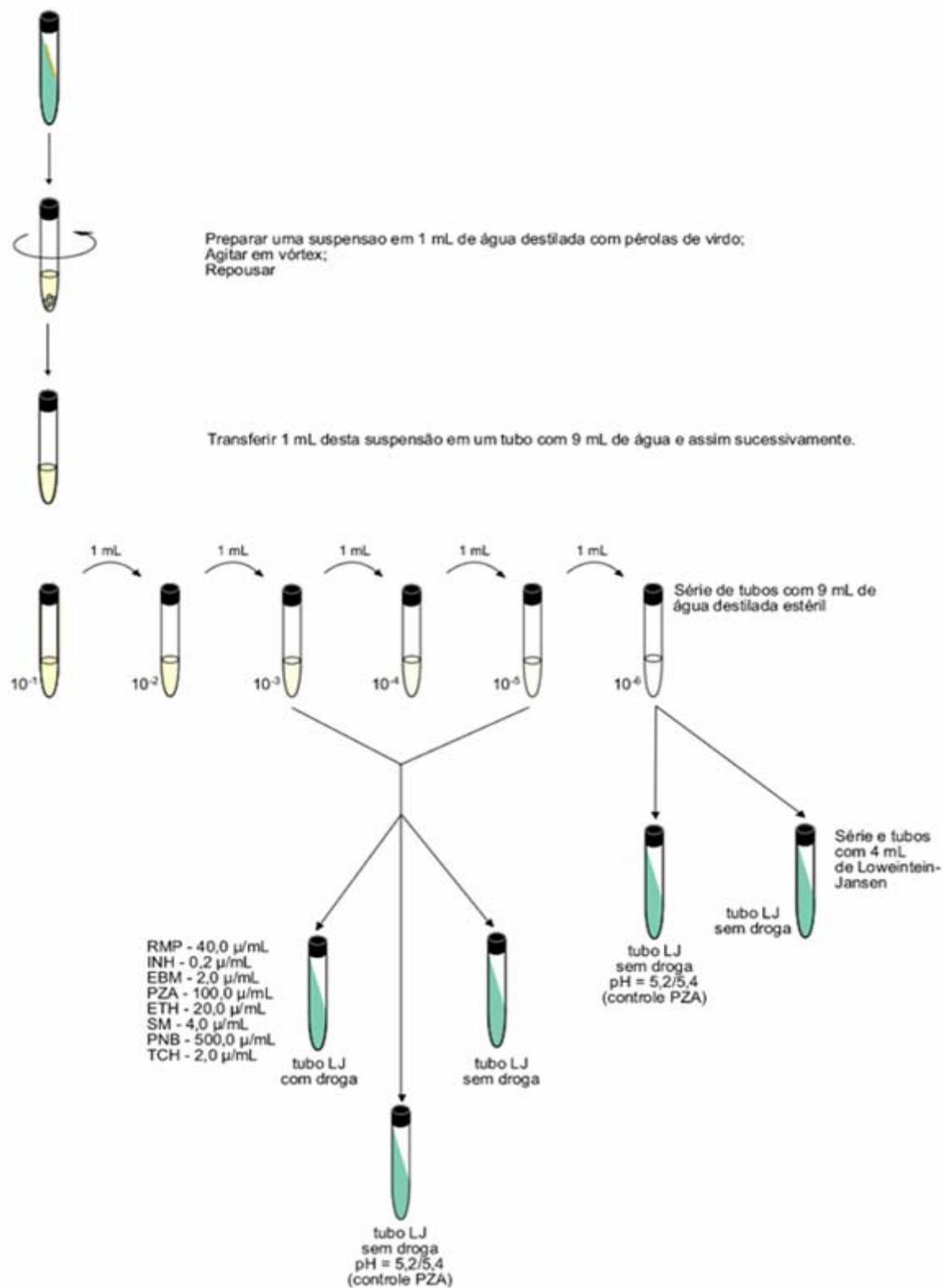


Figura 5 Esquema para teste de sensibilidade indireto. Cultura em Lowenstein-Jansen (L-J)

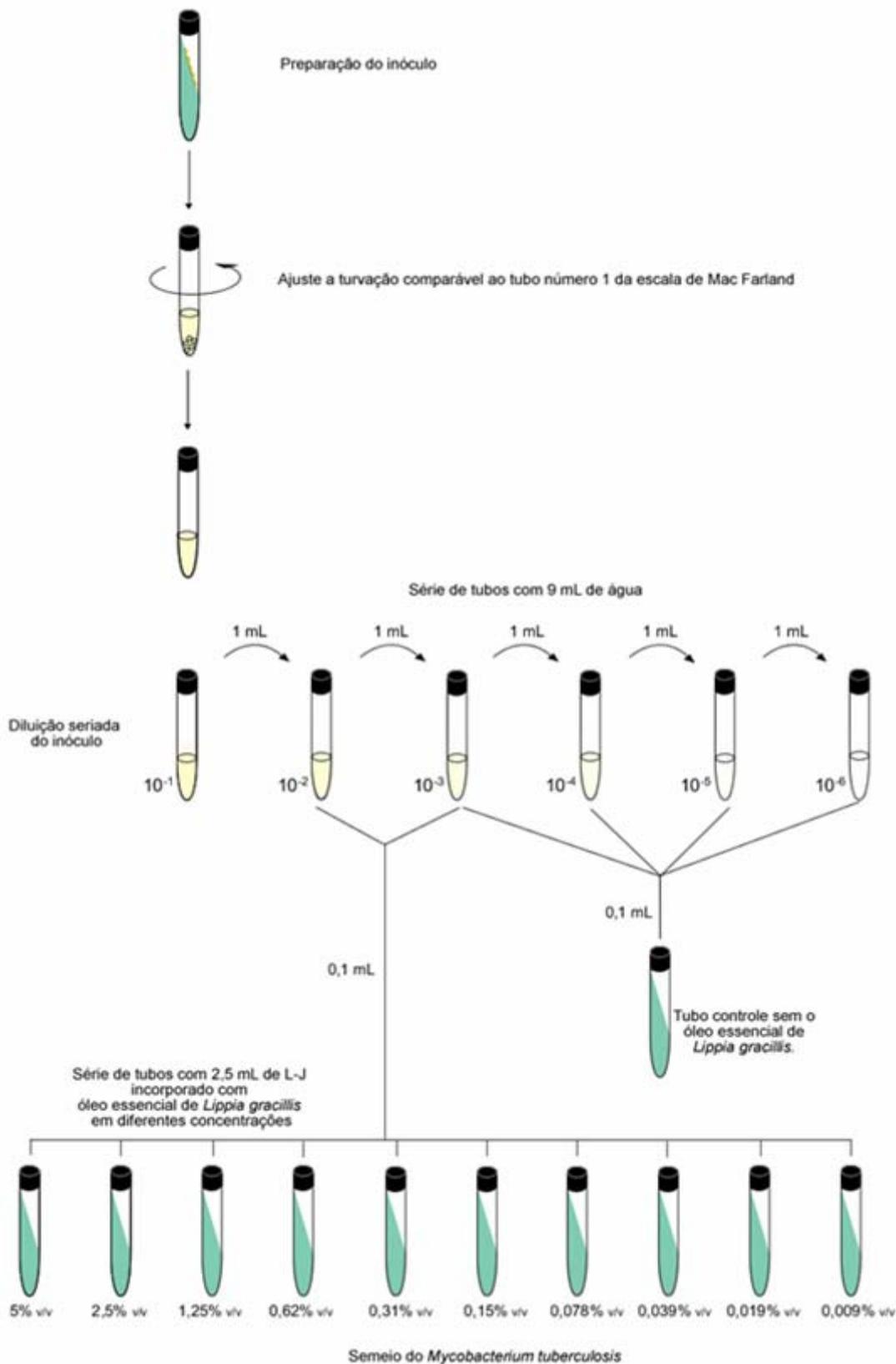


Figura 6 Teste de sensibilidade indireto. Cultura em Lowenstein-Jansen (L-J) incorporado com óleo essencial de *Lippia gracillis*

6.2 CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS PARA O ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia gracillis*.

O critério para interpretação do método das proporções-teste indireto para o óleo essencial de *Lippia gracillis* foi definido, a proporção de mutantes resistente foi estabelecida em 1% acima da qual a população foi considerada resistente (MOREIRA, ANNO, LEITE, 1997).

Paralelamente à determinação da população de mutantes resistentes ao óleo essencial de *Lippia gracillis*, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM), definida como a menor concentração do óleo essencial de *Lippia gracillis* que inibiu mais que 99% da população bacteriana (RASTOGI et al. 1998).

Após a leitura do teste das proporções foi realizado o cálculo da porcentagem de bacilos resistentes. A proporção entre células resistentes e a população do inóculo original foi calculada e expressa em porcentagem. Quando esta porcentagem foi superior ou igual à proporção crítica estabelecida para cada droga, a amostra foi considerada resistente e para o óleo essencial de *Lippia gracillis* esta proporção crítica foi estabelecida em 1%. Acima da qual a proporção de mutantes foi considerada resistente.

Cálculo da Porcentagem de Bacilos Resistentes

$$\frac{\text{Nº de colônias no tubo com droga ou óleo}}{\text{Nº. de colônias no tubo controle}} \times 100$$

7. RESULTADOS

7.1 IDENTIFICAÇÃO - BACILOSCOPIA

Após análise da baciloscopia dos esfregaços, realizados a partir de escarro de pacientes apresentando sinais e sintomas de tuberculose pulmonar, corados pelo método de Ziehl-Neelsen foram observados, por microscopia ótica, com objetiva de 100X e ocular de 10X, bacilos finos e longos, alguns ligeiramente curvos, corados pela fucsina fenicada em vermelho, classificados como álcool ácido resistentes (Figura. 7). Observa-se um fundo azul da contra coloração com azul de metileno formando um contraste com o bacilo corado pela fucsiana em vermelho.

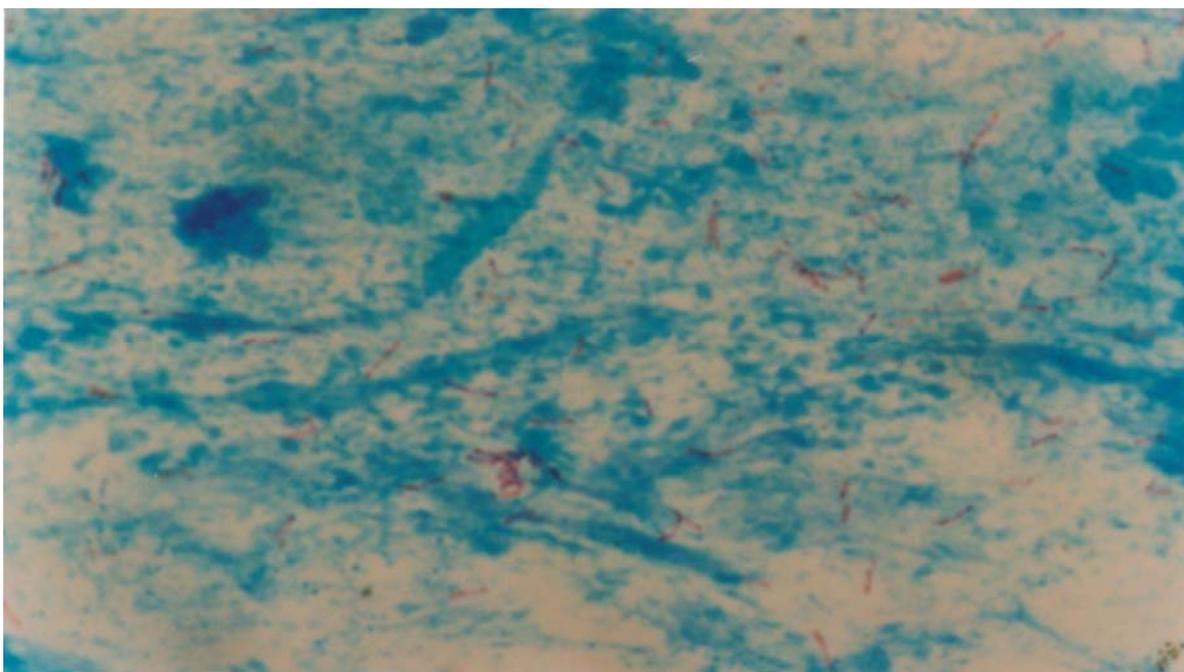


Figura 7 *Mycobacterium tuberculosis* microscopia ótica aumento de 1000X

7.2 ISOLAMENTO

O crescimento em meio de cultura Lowenstein-Jansen, ocorreu em uma temperatura de incubação de 36 a 37°C, em um período de 20 a 30 dias caracterizando micobacteria de crescimento lento. As colônias desenvolveram-se na superfície do meio sem alterar a cor do mesmo, com aspecto rugoso, com coloração característica camurça e ausência de pigmentação (Figura 8).



Figura. 8 Cultura de *Mycobacterium tuberculosis* em meio de Lowenstein-Jansen.

7.3 IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE

O teste de inibição de crescimento foi realizado em presença do ácido ρ -amino benzóico (PNB 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para identificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que teve seu crescimento inibido, diferente de outras micobactérias que são resistentes. (Figura 9). Foram também realizados, o teste de crescimento em presença da hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Fig. 10), que separou o *Mycobacterium tuberculosis*, que é resistente dos outros membros do complexo *Mycobacterium*

tuberculosis que são sensíveis. O teste de acúmulo de niacina (Figura 11), a redução de nitrato a nitritos (Figura 12) e a produção de catalase termoestável a 68°C (Figura 13).



Figura. 9 Testes de inibição de crescimento em presença de PNB (500 µg/mL).



Figura.10 Crescimento em presença do TCH (2 µg/mL).

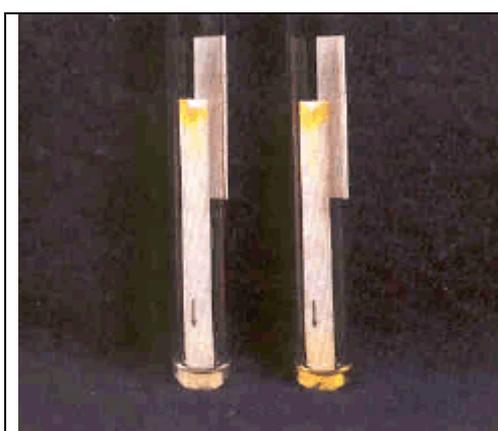


Figura.11 Teste de acúmulo de niacina.



Figura.12 Reação positiva para a redução de nitrato a nitrito.

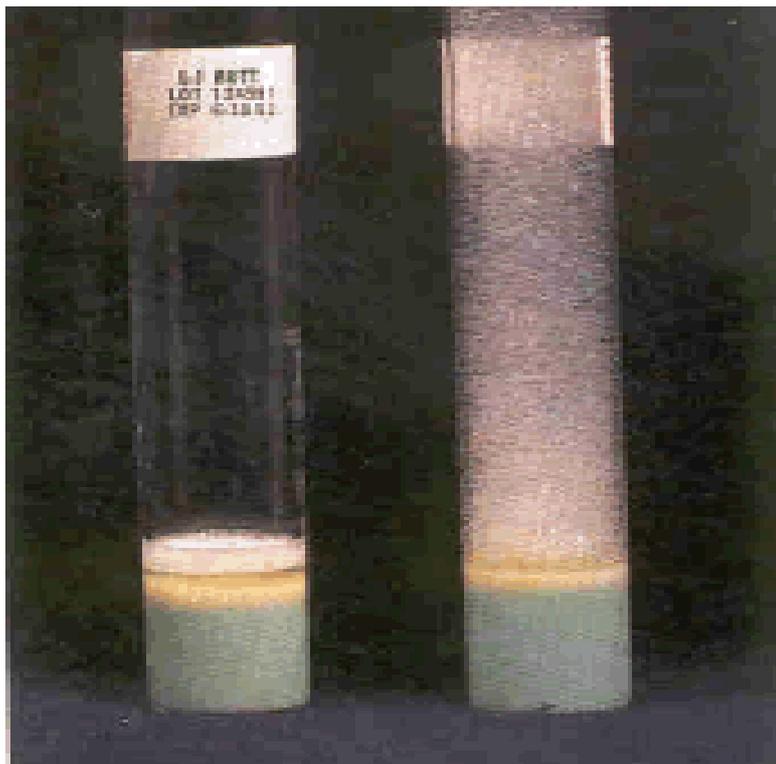


Figura. 13 Reação positiva (à esquerda) presença da catalase a 68° C.

Através destes testes foram isoladas e identificadas quatorze cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

7.4 SENSIBILIDADE DO *Mycobacterium tuberculosis* ÀS DROGAS E AO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia gracillis*.

O perfil de sensibilidade das cepas estudadas foi determinado, cinco delas foram resistentes à isoniazida (33,3%), duas ao etambutol (13,3%), uma a etionamida e estreptomicina (6,7%), três a rifampicina (20%) e todas foram sensíveis a pirazinamida (100%).

A percentagem de mutantes resistente de *Mycobacterium tuberculosis* às drogas tuberculostáticas e ao óleo essencial de *Lippia gracillis* bem como a concentração inibitória mínima deste último estão apresentados na Tabela 3.

TABELA.3 Comparação de atividade antimicobacteriana do óleo essencial de *Lippia gracillis* com os tuberculostáticos

<i>M. tuberculosis</i>	Óleo essencial de <i>Lippia gracillis</i>		Drogas tuberculostáticas (µg/mL)					
	Cepas	MIC (% v/v)	PMR % (x ± δ)	PZA	EMB	ETH	RPM	INH
LC01	0.31	0.64 (± 0.15)	≤10	≤1	≤10	≥1	≤1	≤10
LC02	0.31	0.67 (± 0.21)	≤10	≤1	≤10	≥1	≤1	≤10
LC03	0.31	0.35 (± 0.07)	≤10	≤1	≤10	≤1	≤1	≤10
LC04	1.24	1.55 (± 0.35)	≤10	≥1	≥10	≥1	≥1	≥10
LC05	0.31	0.07 (± 0.09)	≤10	≤1	≤10	≤1	≤1	≤10
LC06	0.31	0.66 (± 0.15)	≤10	≤1	≤10	≤1	≤1	≤10
LC07	0.25	0.60 (± 0.28)	≤10	≤1	≤10	≥1	≥1	≤10
LC08	0.31	0.64 (± 0.21)	≤10	≤1	≤10	≤1	≤1	≤10
LC09	0.31	0.35 (± 0.21)	≤10	≤1	≤10	≤1	≤1	≤10
LC10	0.62	0.76 (± 0.30)	≤10	≤1	≤10	≤1	≤1	≤10
LC11	0.31	0.78 (± 0.14)	≤10	≤1	≤10	≤1	≤1	≤10
LC12	0.62	1.5 (± 0.07)	≤10	≥1	≤10	≥1	≥1	≤10
LC13	0.15	0.44 (± 0.33)	≤10	≤1	≤10	≤1	≤1	≤10
LC14	0.31	0.66 (±0.15)	≤10	≤1	≤10	≤1	≤1	≤10
H37Rv	0.31	0.24 (± 0.14)	≤10	≤1	≤10	≤1	≤1	≤10

CMI – Concentração inibitória mínima determinada a 1% método das proporções- teste indireto com meio de Lowenstein-Jensen.

PMR- Proporção de mutantes resistentes, x - média aritmética, δ- desvio padrão. valores estabelecidos pela OMS em µg/mL para classificação em micobacteria sensível ou resistente para PZA (pirazinamida) , EMB (etambutol), ETH (etionamida), INH (isoniazida), RPM (rifampicina) e SM (estreptomina).

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que 86,7% das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* foram sensíveis ao óleo essencial de *Lippia gracillis* cuja proporção de mutantes resistentes foi inferior a 1%, em concentrações do óleo que variaram de 0,15 a 0,62 % v/v.

Embora resistentes a isoniazida, as cepas LC01, LC02 e a isoniazida associada a rifampicina LC07, as quais perfizeram 20% do total das cepas de micobactérias estudadas, mostraram-se sensíveis ao óleo essencial de *Lippia gracillis* demonstrando o poder bacteriostático deste composto. Analisando as cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogas resistentes (13,3%), representadas neste estudo pelas cepas LC04, resistente ao etambutol, etionamida, isoniazida, rifampicina, estreptomicina e LC12 resistente etambutol, isoniazida, e rifampicina apresentaram resistência ao óleo essencial de *Lippia gracillis* com índices de mutantes resistentes, cujos valores foram da ordem de 1,5% v/v. Os resultados apresentados em concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de *Lippia gracillis* situaram-se entre 0,15 a 0,62% v/v para as cepas sensíveis ou que mostraram resistência a rifampicina e isoniazida, e de 0,62 a 1,2% v/v para as cepas multidrogas resistentes.

A proporção de bacilos resistentes em cada população de *Mycobacterium tuberculosis* frente ao óleo essencial de *Lippia gracillis* variou de 0,24 a 0,78 % e foi dependente da cepa estudada.

8 DISCUSSÃO

Os óleos essenciais são fontes potenciais de componentes antimicrobianos. Os resultados de pesquisas anteriores, contudo, dificilmente podem ser correlacionados com estudos atuais, visto que os métodos empregados para testar a atividade dos compostos não são padronizados (LEMOS et al. 1990; MOREIRA et al. 1997).

A terapêutica disponível para o tratamento da tuberculose é reduzida quando a comparamos com outras doenças infecciosas. O aumento do número de casos de tuberculose causado por cepas resistentes aos fármacos tuberculostáticos têm impulsionado as pesquisas que visam à obtenção de novas drogas mais ativas e menos tóxicas (RASTOGI et al, 1998; ZHANG, POST-MARTINS, DNKIN, 2006).

A rica biodiversidade brasileira representa uma fonte inesgotável destas novas moléculas. Muitas plantas são utilizadas no tratamento de várias doenças tropicais como

malária, esquistosomose, leishimaniose, infecções fúngicas e bacterianas pelas populações de baixas classes econômica (ALVES et al. 2000; MATOS, 2000).

Lippia gracillis é uma destas plantas, nativa da região semi-árida do nordeste do Brasil é utilizada popularmente como vermífugo, anti-séptico e antimicrobiano (LEMOS 1992; GIRÓN et al 1991). Quanto a sua atividade antimicobacteriana até o momento não se tem relato algum.

Os componentes majoritários dessa espécie são o carvacrol ou seu isômero o timol, compostos com reconhecida atividade antimicrobiana. A sensibilidade das micobactérias ao óleo essencial de *Lippia gracillis* poderá estar relacionada a interações dos seus componentes majoritários com os lipídeos da parede celular após a qual haveria desorganização na sua estrutura. Esta hipótese foi defendida por Maruzella and Sicurella (1960) quando estudaram a atividade antimicrobiana de cento e trinta e três diferentes óleos essenciais e observaram a alta susceptibilidade do *Mycobacterium avium* em relação aos outros microrganismos. Esta hipótese foi confirmada em estudos com *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* nos quais o timol e o carvacrol em concentrações inibitórias do crescimento microbiano desintegrou a membrana externa (KNOBLOCH et al. 1988; LEMOS et.al.1992).

O caráter lipofílico destes monoterpenos cíclicos os conduzirá preferencialmente para a membrana citoplasmática. Isto resultará na expansão, aumento na fluidez membranar e inibição de enzimas ligadas a respiração celular (AGUIAR, MATOS,1983). O óleo essencial de *Lippia gracillis* mostrou atividade inibitória sobre o *Mycobacterium tuberculosis* e diferenças na sensibilidade a este óleo essencial foi dependente da cepa estudada.

Este estudo mostrou que óleo essencial de *Lippia gracillis* Shauer foi ativo frente a cepas selvagens de *Mycobacterium tuberculosis*, um dos microrganismos mais patogênicos ao homem. Este óleo também apresentou atividade frente a cepas resistentes a dois quimioterápicos do esquema primário de tratamento da tuberculose, ressaltando a possibilidade do desenvolvimento de uma nova droga ativa para inclusão no esquema básico de tratamento da tuberculose

As cepas multidroga resistente citadas neste estudo não responderiam ao tratamento com os esquemas básicos rifampicina, isoniazida, pirazinamida ou mesmo esquema adicionado de etambutol. Nestas cepas o óleo essencial de *Lippia gracillis* não mostrou

atividade, provavelmente por estes microrganismos terem sofrido pressão seletiva exercida por exposição prévia a várias drogas, o que poderia ter levado ao desenvolvimento de diferentes mecanismos de resistência.

Analisando a efetividade das drogas clássicas e do óleo, percebemos que todas as cepas sensíveis às drogas tuberculostáticas também foram sensíveis ao óleo essencial de *Lippia gracillis*; apenas duas cepas multidroga resistente foram resistentes ao óleo essencial de *Lippia gracillis* e as drogas clássicas simultaneamente; as cepas tiveram uma performance de sensibilidade ao óleo maior que aos tuberculostáticos testados, 86,7 % contra 66,6%.

9 CONCLUSÕES

O óleo essencial de *Lippia gracillis* Shauer apresentou atividade frente a cepas de *Mycobacterium tuberculosis* e diferenças na sensibilidade a este óleo essencial, foi dependente da cepa estudada.

O óleo essencial de *Lippia gracillis* apresentou atividade frente a cepas com resistência a dois tuberculostáticos isoniazida e isoniazida mais rifampicina, demonstrando o potencial de ação deste óleo.

Novos estudos serão necessários para elucidar os componentes do óleo, identificar a atividade dos compostos e isolar as moléculas responsáveis por esta atividade.

Quatorze cepas de *Mycobacterium tuberculosis* foram isoladas e identificadas através de técnicas preconizadas pela OMS.

Das quinze amostras avaliadas quanto à sensibilidade aos antituberculostáticos cinco foram resistentes a isoniazida, duas ao etambutol, uma a etionamida e estreptomicina, três a rifampicina, e todas foram sensíveis ao pirazinamida.

As cepas LC 04, LC07, e LC12 mostraram resistência a várias drogas.

Embora resistente a isoniazida as cepas LC01, LC02 e LC07 mostraram-se sensíveis ao óleo essencial de *Lippia gracillis*.

Treze cepas mostraram-se sensíveis ao óleo, inclusive àquelas que demonstraram resistência à isoniazida (LC01, LC02, LC07).

Após comparação da sensibilidade drogas e óleo, concluímos que todas as cepas sensíveis aos tuberculostáticos testados também foram sensíveis ao óleo essencial de *Lippia gracillis*.

Sessenta por cento das cepas que se demonstraram resistente a alguma droga tuberculostática apresentaram-se sensíveis ao óleo essencial de *Lippia gracillis*.

Apenas 02 cepas LC04 e LC12 classificadas como multidrogas resistentes foram também resistente ao óleo, apresentando uma população de mutantes resistente equivalente a 1,5%.

O percentual de *Mycobacterium tuberculosis* resistente ao óleo essencial de *Lippia gracillis* variou de 0,24 a 0,78 % e foi dependente da cepa estudada. A CIM também variou em função da cepa, cujos valores foram enquadrados entre 0,15 a 1,25% v/v.

10 PERSPECTIVAS

Este estudo avaliou que o óleo essencial de *Lippia gracillis* mostrou atividade frente a cepas de *Mycobacterium tuberculosis* analisadas.

Abre perspectivas para estudos de elucidação dos componentes majoritários, identificação das moléculas ativas, determinação de possíveis sinergismos entre componentes, toxicidade, estudos *in vivo* e de desenvolvimento em tecnologia farmacêutica.

Modificações estruturais das moléculas ativas podem potencializar a ação dos mesmos vindo a atingir cepas mutidrogas resistentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, L. B. M. A; MATOS, F. J. A. *Atividade antibiótica de plantas medicinais da flora nordestina. Ciência e Cultura*, v. 36, p. 464, 1983.
- ANDREWS, R.E; PARKS, L.W; SPENSE, K. D. *Some effects of Douglas-fir terpenes on certain microorganisms. Applied Environmental Microbiology*, v. 40, n. 2, p. 301-304, 1980.
- ALVES, T. A; SILVA, A. S; BRANDÃO, M; GRANDI, T. S. M; SMÂNIA, E. F; ZANI, C. L. *Biological screening of Brazilian medicinal plants. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 367-373, 2000.
- AZIS, M. A; LASZLO, A; RAVIGLIONE, M; REITER, H; ESPINAL, M; WRIGHT, A. *Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. World Health Organization, Geneva*, 2ª ed. 71 p. 2003.
- BARROW, W. *Processing of mycobacterial lipids and effects on host responsiveness. Frontiers in Bioscience*, v.2, p. 387-400, 1997.
- BLUNBERG, H. M. *Treatment of tuberculosis. American Journal Respiratory Critic Care Medicine*, v.167, p.603-662, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. *Manual de Bacteriologia de tuberculose*, 2ª edição, Rio de Janeiro, 1994. 115p.
- BRENNAN, P. J; DRAPER, P. *Ultrastructure of Mycobacterium tuberculosis. IN: Bloom, B. R. Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control. Washington, D.C: American Society Medicine Press*, p. 271-284, 1994.
- BROOKS, G.F; BUTEL, J.S; MORSE, S.A. *Jawetz, Melnick & Adelberg. Microbiologia Médica*, 21 ed. Rio de Janeiro: ed. Guanabara Koogan S.A. 2000.
- CANETTI, G. N; RIST, N; GROSSET, J. *Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires por la méthode des proportions. Rev. Tuberc. Pneumol.*, 27: 217-272, 1963.
- CHERNOCH, P; ENNS, R. K; SAUBOLLE, M. A; WALLACE JR. R. J. *Cumulative techniques and procedures in clinical microbiology- Cumitech*, 16a: Laboratory.
- CYNAMOM, M. H; KLEMENS, S. P; SHARPE, C. A; CHASE, S. *Activities of several novel oxazolidones against Mycobacterium tuberculosis in a murine model. Antimicrobial agents chemotherapy*, v. 43, p.1189-1191, 1999.
- COBERT, E. L. *The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. Archives Internal Medicine*, 163, 1009-1021. 2003.

- CONSENTINO, S; TUBEROSO, C. L.G; PISANO, B; SATTA, M; MASCIA, V; ARZEDI, E; PALMAS, F. *In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus Essential Oils*. Letters Applied Microbiology v.29, p.130-135, 1999.
- COLE, S. T; EIGLMEIR, K; PARKHILL, J. *Massive gene decay in the leprosy bacillus*. Nature, v. 409, 1007-11, 2001.
- COLL, P. *Fármacos com atividade frente a Mycobacterium tuberculosis*. Enfermidades infecciosas y Microbiologia Clínica, v. 21, supp. 6, p. 299-308, 2003.
- CORTINAS N. C; FERNANDEZ, M; VALETA, M. I; URIART, M. R; MOGDASY, M. C. *Caracterización genotípica de 80 cepas Del género Mycobacterium in Uruguay*, Revista Médica, Uruguay, v. 18, p.230-23, 2001.
- COX, S. D; MANN, C. M; MARKAHAM, J. L; BELL, H. C; GUSTAFSON, J. E; WARMINGTON, J. R; WYLLIE, S. G. *The mode of antimicrobial action of essential oil of Malaleuca alternifolia (tea tree oil)*. Journal Applied Microbiology, v. 88, supp. 1, p. 170, 2000.
- COX, S. D; GUSTAFSON, J. E; MANN, C. M; MARKHAM, J. L; LIEW, Y. C; HARTLAND, R. P; BELL, H. C; WARNINGTON, J. R; WYLIE, S. G. *Tea tree oil cause K+ leakage and inhibit respiration in Escherichia coli*. Letters Applied Microbiology, v. 26, p. 355-358, 1998.
- CRAVEIRO, A. A; ALENCAR, J. W; MATOS, F. J. A; ANDRADE, C. H. S; MACHADO, M. I. L. *Essential oil from Brazilian Verbenaceae genus Lippia*. Journal Natural Products, v.44, supp.5, Jul-Aug. 598-601, 1981.
- CRAVEIRO A. A; MATOS, F. J; ALENCAR, J. W. *Óleos essenciais na produção industrial*. Revista Química Industrial, n. 19, p. 60-64, 1989.
- CRAWS, M; DROBNIEWSKI, F. A. *Molecular techniques in the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis and the detection of drug resistance*. Annal New York Academy of Sciences, p. 138-145, 2003.
- DAVID, H. L; RASTOGI, N; CLAVEL-SERES, S; CLEMENT, F; THOREL, M. F. *Structure of the envelope of Mycobacterium avium*. Zbl. Bakt HYG, v. 264, p. 49-66, 1987.
- DAVID, H. L. *Basis for lack of drug susceptibility of atypical mycobacteria*. Journal Infectious Diseases, v. 3, 878-884, 1981.
- DAVID, H.L; LÉVY-FRÉBAULT, V; THOREL, M.F. *Methods de Laboratoire pour Mycobacteriologie Clinique*. Institut Pasteur, Paris, 1989.
- DRAPER, P. *The structure of the mycobacterial cell envelope is not yet understood*. Research Microbiology, v.1 42, p. 420-422, 1991.

DRAPER, P. *The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers*. *Frontiers in Bioscience*, v. 3, p. 1253-1261, 1998.

ELZÉBT, J.P. *Listo of bacterial names with stading in momenclature*. Societé de Bactériologie Systématique et a Veterinare. França. Disponível em: < url://http//www.bacteria.cit.fr > Acesso em 7/8/2006.

ESTEVEES, A. *Propriedad intellectual, patenttes y acceso a los medicamentos em los países em desarrollo*. *GAC Sanet*, v.15 (6), p. 546-549, 2001.

FALKINHAN, J. O. *Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 9, n. 2, p. 1777-215, 1996.

FILHO, A. C; KRISTI, A. L; BARRETO, W. A; LEMOS, A. C. M; NETTO, A. R; GUIMARÃES, C. A; SILVA, C. A; SANT'ANNA, C. C; HADDAD, D. J; LIMA, D. S; MATOS, E. D. *II Consenso brasileiro de tuberculose*. *Journal Brazilian Pneumology*, v.30, Suppl. 1, São Paulo, June, 2004.

FEITOSA J. G. R. *Avaliação antimicrobiana do óleo essencial de Lippia sidoides realizada pelo método de difusão em placa*. *Revista da Sociedade Brasileira de Química*.

FUNARI, C. S; FERRO, V. O. *Uso ético da biodiversidade brasileira: Uma necessidade e oportunidade*. *Revista Brasileira de Farmacognosia. Journal of Pharmacology*, vol. 15, supl. 2, p. 178-182, Abr./Jun., 2005.

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

GRANGE, J.M. *The biology of the genus Mycobacterium*. *Journal of applied Bacteriology*, v. 81, p. 1-9, 1996.

GUIA DE VILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Comitê técnico-científico de assessoramento à tuberculose e Comitê assessor para co-infecção HIV-tuberculose. Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. 100p. 2002.

GOODMAN, G. *As Bases farmacológicas da terapêutica*, 9 ed. Rio de Janeiro. MC grow hill, 1996.

GUTIERREZ, R. S; PAULOTT, W. P. *Métodos diagnósticos*. In: *Tuberculose epidemiologia, diagnóstico e tratamento em clínica e saúde pública*. PICON, P. D; Rizzon, C. F. C; OTT, W. P. Editora médica e científica, p. 21-34, Rio de Janeiro, 1993.

HELANDER, I. M; ALAKOMI, H. L; KYOSTI, L-; MATTILA-SANDHOLM, T; POL, I; SMID, E.J; GORRIS, L. G. M; VON-WRIGHT, A. *Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria*. *Journal agriculture Food Chemistry*, v. 46, p. 3590-3595, 1998.

HUXLEY, A. *The new royal horticultural Society Dictionary of Garden*. p. 94, Macmilian press, México, p. 94, 1992.

JACOBS, M. R. *Activity of quinolonas against Mycobacteria*. *Drugs*, v. 58, Suppl. 2, p. 19-22, 1999.

JOLY, A. B. *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*. Companhia editora Nacional, São Paulo, ed.11, 1993.

KARAPMAR, M; AKUTUG, S. E. *Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole*. *Journal Food Microbiology*, v. 4, p. 161-166, 1987.

KNOBLOCH, K. PAULI, A; IBERL, B; WEIS, N; WEIGAND, H. *Antibacterial activity and antifungal properties of essential oil components*. *Journal Essential Oils Reserach* v. 1, p. 119-128, 1988.

KONEMAN, E. W. *Diagnóstico microbiológico. Texto e atlas colorido*. 5ª edição. Rio de Janeiro, Ed. Médica e científica Ltda., 2001.

KREMER, L; BESRA. G. *Re-emergence of tuberculosis: strategies and treatment*. *Expert Opin. Investigation Drugs*, v. 11, p. 153-157, 2002.

KUNLE, O. *Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from Lippia multiflora leaf extract*. *Phytomedicine*, v. 10, p. 59, Nigeria, 2003.

LEAL-CARDOSO, J. H; Fonteles, M. C; *Pharmological and anticicrobial studies on different tea-tree oils Maleleuca alterniflora, leptospermum Scoparium or Manuka and Kunzea ericoides or Kanuca, originating in Australia and New Zeland*. *Pytotherapy Research*, v.14, p. 623-629, 1999.

LEMOS, E. L. G; MATOS, F. J.A; ALENCAR, J. W; CRAVEIRO, A. A; CLARK, A. M; MCCHESENEY, J. A. *Antimicrobial Activity of essential oils of Brazilian plants*. *Phytoterapy Research*. v. 4, n.2, p. 82-84, 1990.

LEMOS, E. L. G; MONTE, F. J. Q; MATOS, F. J. A; ALENCAR, J. W; CRAVEIRO, A. A; BARBOSA, R. C. S. B; LIMA, E. O. *Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Brazilian plants*. *Fitoterapia*, V. 63,P. 266-268,1992.

LORENZI, H; MATOS, F. J.A. *Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas*. *Farmacologia*, Ed. Nova Odessa, São Paulo, 615p. 2002.

MARUZELLA, J. C; SICURELLA, N. A. *Antibacterial Activity of Essential Oil Vapors*. *Journal American Pharmaceutical Association*, Scientific edition. New York, v. 49, p. 692-694, 1960.

MATOS, F. J. A; *Plantas medicinais. Guia de seleção e emprego medicinal de plantas do Nordeste*. IOCE Fortaleza, 1885.

MATOS, F.J.A; MACHADO, M. I. L; CRAVEIRO, A. A; ALENCAR, J. W; SILVA, M. G. V. *Medicinal plants of northeast Brazil containing thymol and carvacrol – Lippia sidoides Cham. and Lippia gracilis H.B.K. (Verbenaceae)*. Journal Essential Oil Research, v. 11, p. 666-668, 1999.

MATOS, M. I. L. *Essential oils of Lippia allnifolia Schau. (Verbenaceae) and Lippia aff. Gracilis H. B. K., two aromatics medicinal shurubs from Notheast Brazil*. Journal Essential Oil Research. 2000.

MATOS, MACHADO; M. I. L; ALENCAR, J. W; MATOS, M. E. O; CRAVEIRO, A. A. *Plants used in traditional medicine of Chine and Brazil*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 86, p. 13-16, 1991.

MATOS, F. J. A. *Plantas Mediciniais, Guia de Seleção e Emprego de Plantas Usadas em Fitoterapia no Nordeste do Brasil*. 2 ed, UFC: Imprensa Universitária, 2000.

MATOS, F. J. *Farmácias vivas: Sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades*. 2 ed. Fortaleza: EUCF, p. 43-46, 1996.

MINOR, L. L; VÉRON, M. *Bacteriologie medicale*. Flammarion Médecine- Sciences. Paris, 1 ed. p. 657-658, 1982.

MOREIRA, R. R. D; ANNO, I. S; LEITE, C. Q. F. *Sensitivity of Mycobacteria to different species of Eucalyptus L'HERIT*. Revista de Microbiologia, v.28, p.256-260, 1997.

MORTON, C. *Atlas of Medicinal Plants of middle América*, Springfield, Illinois, USA, v. 1, p.745-750, 1981.

O'BRIEN, R. J. *The epidemiology of non tuberculosis mycobacterial diseases in the United States: results from a national survey*. American Review of Respiratory Disease, v. 135, p. 1007-1014, 1987.

NACHEGA, J. B; CHAISON R. E. *Tuberculosis drug resistance: a global treatment..* Clinical Infectious Disases, 36, suppl. 1, S24-S30, 2003.

NINIKIN, D. *Chemical Pricipiles in the organization of lipid components in the mycobacterial cell envelop*. Research Microbiology, v. 142, p. 423-429, 1991.

PASCUAL, M. E; SLOWING, K; CARRETERO, E; SÁNCHEZ, M. D; VILLAR, A. *Lippia: Traditional uses, chemistry and pharmacology: a review*. Journal Ethnopharmacology, v. 76, p. 201-214, 2001.

PAULI, A; HEINZ, S. *Specific seletion of essential oil compounds for treatment of children's infection diseases*. Pharmaceuticals, v. 1, p. 1-30, 2004.

PENSO, G. *L'e indentification ds micobactérias à la lumière constitution antigenic*. In: Premier colloque International sur lês mycobactéries, Ed. P.G. Janssens.

PESSOA, O. D. L; CARVALHO, C. M. B; SILVESTRE, J. O. V. L; LIMA, M. C. L; NETO, R. M; MATOS, F. J. A; LEMOS, T. L. J. *Antibacterial activity of the essential oil from Lippia aff. gracilis*. Fitoterapia, v. 76, p. 721-714, 2005.

RASTOGI, N; ABAUL, L. J; GOH, K. S; DEVALLOIS, A; PHILOGÈNE, E; BOURGEOIS, P. *Antimycobacterial activity of chemically defined natural substances from the Caribbean flora in Guadeloupe*. FEMS Immunology Medical Microbiology, v. 20, p. 267-273, 1998.

RASTOGI, N. *Structure and functions of the cell envelope in relation to mycobacterial virulence, pathogenicity and multiple drug resistance*. Research Microbiology, v.142, p. 419, 1991.

RASTOGI, N. *The introduction to nomenclature and pathogenesis*. Reveu Scientifique techniques, v. 20, suppl. 1, p. 21-54, 2001.

RASTOGI, N. *Potencial drug targets for Mycobacterium avium defined by using radiometric drug-inhibitor combination techniques*. Antimicrobial Agents Chemotherapeutic, v. 145, p. 243-252, 1994.

ROBBERS, J. E; SPEEDIE, M. K; TYLER V. E. *Farmacognosia biotecnologia*. São Paulo: Ed. Premier, cap. 6, p. 97, 1997.

ROCHA, K. B; VIEIRA, N. C; NEVES, F.A.R. *Novas drogas e patentes* Conselho Nacional Pesquisa, Instituto do milênio, disponível em: < http://www.cqee.org.br/arquivos/rhf/pl_nd_francisco_neves.sdf. > acesso em 8 agos. 2006.

SANTOS, F. J. B. *Composition and biological activity of essential oils from Lippia oregnoides HBK*. Journal of Essential Oils Research, set/out. 2004.

SEVERO, L. C. *Micobacteriose e SIDA (AIDS)* In; epidemiologia, diagnóstico e tratamento em clínica e saúde pública (Picon, P. D; Rizzon, C. F. C; OTT, W. P) Editora Médica científica, Rio de Janeiro, p. 619-630, 1993.

SIKKEMA, J; BONT, J. A. M; POOLMAN, B. *Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes*. Journal of Biological Chemistry, v.269, p. 8022-8028, 1994.

SINAN, Sistema Nacional de Agravos e Notificação. Disponível em < <http://saude.gov.br/sina.web> > acessado em junho 2006.

STOVER, C. K; WARRENER, P; VanDEVANTER, D. R; SHERMAN, D. R; ARAIN, T. M; LANGHORNE, M. H; ANDERSON, S. W; TOWELL, J. A; YAN, Y. A. *Small molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis*. Nature, 2000, 405,961-966, 2000.

PALACI, M; HADAD, D. J; DETTONI, V. V; DIETZE, R. *Atividade bactericida precoce: uma metodologia segura enecessária*. Jornal Brasileiro de Pneumologia, v. 30, n. 2, São Paulo, mar/apri, p. 26, 2004.

PFYFFER, G. E. *Drug-resistant tuberculosis: resistance mechanisms and rapid susceptibility testing*. Schweiz Med Wochenschr, v. 130, p. 1909-13, 2000.

Terblanché, F. C; Kornelius, G. *Essential oil constituents of genus Lippia (Verbenaceae)* A literatura review. Journal of Essential oil Research, v. 8, p. 471-484, 1996.

The Merck Index. U.S.A.: Whitehouse Station. 12 ed. p. 308 and p. 1604, 1996.
The New York Botanical Garden. *Catalogue vascular plant species of eastern Brazil*. Disponível em:
< <http://www.nybg.org/bsci/hcol/sebc/Verbenaceae.htm> > acessado em 08/ago. 2006.

TORTORA, G. J; FUNK, B. R; CASE, C. L. *Microbiologia*. 6 Ed , Porto Alegre, editora Artmed, 2003.

TROUILLER, M P; OLIARO, P. *Drug development output during 1975-96: what proportion for tropical diseases?* International Journal infectious Diseases, v.3, p. 61-63, 1999.

URIBE, S; RAMIREZ, T; PENA, A. *Effects of β -pimene on yeast membrane functions*. Journal Bacteriology, v. 161, p.1195-1200, 1985.

VERONESI: Tratado de Infectologia, 3ª Ed. Editor científico: FOCACCIA, R. vol. II, São Paulo 2005.

WORD HEALTH ORGANIZATION. *Global tuberculosis control: Surveillance, planning, financing*. WHO report 2005, Genebra, (WHO/HTM/tuberculose/2005.349).

WOLINSKY, E. *Non tuberculous mycobacteria and associated diseases*. American Review of Respiratory Diseases. v. 119, p. 107-159, 1979.

ZHANG, Y; POST-MARTINS; K. DENKIN, S. *New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy*. DDT- v. 11, n. ½ ,p. 21-27 Jan., 2006.

ANEXO

Antimycobacterial Activity to Essential Oil from *Lippia gracillis* Shauer

Cristiano Marcelino Júnior²

Valdelucia Oliveira Cavalcanti¹

Eulália Azevedo Ximenes^{3*}

¹Pós Graduação em Ciência Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco

² Departamento de Química , Universidade Federal Rural de Pernambuco

³ Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco

*eulaliaximenes@yahoo.com.br

phone: 0xx8121268346

fax: 0xx812126834

ABSTRACT

Lippia gracillis Shauer, Verbenaceae, it is a native shrub of the region northeast Brazil. The essential oil from leaves *Lippia gracillis* Shauer was obtained by hydrodistillation using Clevenger-type system. This oil was screened to chemical composition and antimicrobial activity against fifteen strains to *Mycobacterium tuberculosis*. The chemical composition of this oil was analyzed using GC-MS and Proportion Method Indirect Test was performed to detect resistant bacilli to essential oil *Lippia gracillis* and tuberculostatic drugs. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined. The chemical analysis of the oil revealed that *Lippia gracillis* contained carvacrol (56.36%), thymol (7.46%), and *p*-cymene (18.91%) as main components. *Mycobacterium tuberculosis* strains 86.7% were sensible to the essential oil of *Lippia gracilis* in concentrations of 0.15-0.62% v/v whose resistant percentage of mutants was inferior 1%. The strains sensible to the tuberculostatics drugs (66.6%) also were sensible to oil in the concentration of the 0.31% v/v, but two strains were presented high percentage of resistant mutants to the essential oil of *Lippia*. Three strains were sensibles to the oil even so has been classified as resistant to the isoniazid one. The essential oil of *Lippia gracillis* is active on *Mycobacterium tuberculosis*. Differences found in sensitivity to this oil were dependents of the strain studied.

Key-words: *Lippia*, *Lippia gracilis*, antimycobacterial activity, *Mycobacterium tuberculosis*, essential oil.

INTRODUCTION

The genus *Lippia* (Verbenaceae), comprises approximately 200 species, mainly distributed in tropical and temperate America and tropical Africa, with only a few species growing in the Old World (Salimena, 2002). Additionally, the higher number of them is placed on Brazil (Romero *et al.*, 1998). Most *Lippia* species are utilized on folk medicine, mainly for the treatment of gastrointestinal and respiratory disorders (Pascual *et al.*, 2001). Some plants also employed as a local antiseptic, as *Lippia gracillis* used for mouth, troath and skin diseases (Lemos *et al.*, 1992).

Lippia gracillis is a plant common in the Northeast Brazil, where grow widely in the semi-arid region, named “caatinga”. Studies revealed that the leaves essential oil have antimicrobial ativity against Gram-positive and Gram negative bacteria yeast and filamentous fungi (Pessoa *et al.*, 2005, Lemos *et al.*, 1992). Furthermore, the chemical composition of leaves essential oils from *L. gracillis* from two different Northeast Brazilian regions shown carvacrol (47,7%) and thymol (30,6%) monoterpenoids as majors components for Piauí (Craveiro *et al.*, 1999) and Ceará states (Lemos *et al.*, 1992) oils respectively.

Although many reports showing that *Lippia gracillis* possesse antimicrobial properties no study have been published sobre antimycobacterial activity on this plant.

The WHO a tuberculosis is responsible for about 1,7 million deaths per year in the world. Exactly after the implementation of the therapy directly observed (DOTS) millions of patients with tuberculosis continue, mainly in countries in development (OMS 2005).

Research directed toward the application of new therapies, obtention of more efficient drugs against MDR –TB are priority (Ducan 2003).

The previous knowledge of the therapeutical potential of the essential oil of *Lippia gracillis*, a study of its chemical composition and its antimicrobial activity against fifteen strains of *Mycobacterium tuberculosis* of which 20% were characterized as Multi Drugs Resistant (MDR-TB) were objectives of the present work.

MATERIALS AND METHODS

Plant material. *Lippia gracillis* Shauer leaves were collected in Ibimirin city, Pernambuco State, Brazil in march 2001. A voucher specimen was deposited in Herbarium Professor Dárdano de Andrade, Universidade Federal Rural de Pernambuco N° 12470.

Essential oil extraction and identification of components

Sample of 1 Kg of air-dried leaves were submitted to steam distillation for 2 hours. The essential oil obtained was dried with anhydrous Na_2SO_4 , sealed in amber vials and stored at 8° C before using to characterization by gas chromatography and antimicrobial assays. The components were identified through CG/MS analysis using a HP5995 GC/MS spectrometer equipped with a DB-5(30mm x 0.25mm) silica fused capillary column using helium as carrier gas and the programmed temperature (4° C/min from 35-180° C, 20° C min to 180-280). The components of the oil were identified using a library search program developed by Craveiro et al 1999 by retention time (RT) and Kovat's Indexes (KI) as auxiliary confirmation by comparison with literature data.

Microorganisms

Mycobacterium tuberculosis H37Rv and fourteen clinical isolated was used in this investigation. These microorganisms were grown as fresh Lowenstein-Jensen slant (Difco) at 35 a 37°C for 28 days. Previous a sensibility evaluation of these strains to pirazinamide (PZA), ethambutol (EMB), ethionamid (ETH), isoniazid (INH), rifampicin (RPM) and streptomycin (SM) was stability by Proportion Method. (David et al. 1989, Canetti et al., 1963)

Proportional Method Indirect Test and Determination of the Minimal Inhibition Concentration (MIC)

To determination the mycobacterium resistance against differents concentrations to essential oil was used the proportion method indirect test with modifications (Aziz et al.2003, Moreira et al 1997)

The bacteria suspensions were adjusted to the optical density of McFarland standard nº1 and subsequent dilutions (10^{-3} , 10^{-4} and 10^{-5}) were prepared in tween 80 / water system (1:100). Three dilutions (10^{-3} , 10^{-4} and 10^{-5}) were used to inoculate the control tubes and two others (10^{-2} and 10^{-3}) to inoculate the test tubes. To detect mycobateria susceptibilidad against essential oil or tuberculostatics drugs, the number of colony forming units grown on oil or drugs medium (test tubes) was compared with the number on the control Lowenstein-Jensen (without oil). The test was realized using ten differents concentrations 5 a 0,009 % v/v to oil or the critical concentration to tuberculostatic drugs. The microorganisms were incubated at 37°C for 30 days. The ratio between resistant cells and the total viable population of the original inoculum was calculated and expressed as a percentage. A rate of resistant mutants to essential oil below 1% was considered the limit of resistant mycobacteria that can be present in a bacilli

population. When the rate was equal or higher than 1% the sample was considered resistant. (David et al. 1989, Canetti et al.,1963).

The minimal inhibition concentration was evaluated by agar dilution method Rastogi et al 1998. The MIC was defined as the lowest drug concentration that inhibited more than 99% of the bacterial population. These assays were performed in duplicate.

RESULTS E DISCUSSION

The average yield of the essential oil the representative samples of *L. gracillis* air-dried leaves was 1.5 %(w/v).

Quantative and analytical results are showed in table 1. Essential oil consisted mainly of hydrocarbon and phenolic monoterpenes, contained as majors components: carvacrol (56.36%), ρ -cymene (18.91%) and thymol (7.46%). Its minor components were γ -terpinene (4.22%), β -myrcene (2.29%), methyl thymylether (2.79%) and thymol acetate (2.98%). As observed in other chemical oil studies from *Lippia* species aromatic monoterpenes co-occur with the structurally related cyclic dienes, terpinen-4-ol and acyclic β -myrcene, suggesting the related biosynthesis these compounds. The same major *L. gracillis* essential oil components (carvacrol/ ρ -cymene/thymol) has been reported previously in the Craveiro et al. 1999 study. It's could be an indicative for a possible chemotype from *Lippia gracillis* leaf essential oil in the "caatinga" natural conditions.

The percentage of *Mycobacterium tuberculosis* resistant mutants to tuberculostatics drugs, to essential oil of *Lippia gracillis* and the Minimal Inhibitory Concentration (CMI) were presented in the table 2.

The results presented in this work show that 86.7% of the strains are sensible to essential oil of *Lippia gracillis* whose ratio of resistant mutants was inferior 1%.

The sensible strains of *Mycobacterium tuberculosis* to all the tuberculostatic drugs (66,6%), were sensible to essential oil in the concentration to 0.31% v/v.

The strains LC04 e LC12 presented high percentage of the resistant mutants to essential oil to *Lippia gracillis* whose values were of the 1.5%.

This strains presented a resistance profile, previous determinate to ethambutol, isoniazid e rifampicin.

The strains LC01, LC02 e LC7, whose resistance to isoniazid was observed show sensibility of the essential oil of *Lippia gracillis*.

The therapeutical available for the treatment of the tuberculosis is reduced when we compare it with other infectious disease.

The increase in the cases of tuberculosis for MDR-TB has stimulated the research of the new and more active molecules (Ducan 2003).

The Brazilian biodiversity represents an inexhaustible source of these new molecules. Many Brazilian plants are used by the population, in the treatment of some disease as malaria, schistosomiasis, leishimaniasis and fungal and bacterial infections (Sartoratto et al., 2004, Lemos et al., 1992, Leal Cardoso et al., 2002).

Lippia gracillis is one of these plants, native of the northeast of Brazil is popularly used as antiseptic and antimicrobial (Lemos et al 1992, Pascoal et al., 2001, Pessoa et al 2005)

The main components these specie are the carvacrol and thymol. They have recognized biological activity.(Lemos et al., 1992, Pascoal et al 2001 Terbranché 2001)

The sensibility of micobacteria to essential oil of *Lippia gracilis* could be related the interactions of the main components of the oil with the lipids of the cellular wall disorganizing its structure. This hypothesis was published by Maruzella and Sicurella et al. 1960. They studied the antimicrobial activity of one hundred and thirty and three different

essential oils and verified that *Mycobacterium avium* has a high sensibility when compared with the other microorganisms.

The carvacrol will preferentially partition from an aqueous phase into membrane structure. This resulted in membrane expansion, increased membrane fluidity and inhibition of a membrane–embedded enzyme. (Andrews 1980, Uribe 1995, Veldhuizen et al 2006).

The essential oil of *Lippia gracillis* is active on *Mycobacterium tuberculosis*. Differences found in sensitivity to this oil were dependents of the strain studied.

REFERÊNCIAS

1. Andrews, R.E.; Parks, L.W.; Spence, K.D. Some effects of Douglas-fir terpenes on certain microorganisms. *Appl. Envir. Microbiol.* 40,(2) 301-304, 1980.
2. Aguiar L.B.M.A.; Matos F.J.A. Atividade antibióticas de plantas medicinais da flora nordestina. *Ciência e Cultura*, 36, 464,1983.
3. Alves, T.A.; Silva, A.F. ; Brandão M.; Grandi, T.S.M.; Smânia E.F; Zani, C.L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Men. Inst. Oswaldo Cruz*, 95: 367-373, 2000.
4. Aziz, M.A.,; Laszlo, A.; Raviglione, M.; Reider, H.; Espinal , M.; Wright, A. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. *World Health Organization*, Geneva, 2^a ed. 71 p. 2003.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. *Manual de Bacteriologia de tuberculose*. 2^a edição, Rio de Janeiro, 1994.
6. Canetti, G.N.; Rist N.; Grosset, J. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires por la méthode des proportions. *Rev. Tuberc. Pneumol.*, 27: 217-272, 1963.
7. Craveiro, A.A.; Alencar, J.W.; Matos, F.J.A.; Andrade. C.H.S.; Machdo, M.I.L. Essential oil from Brazilian Verbenaceae genus *Lippia*. *J. Nat. Prod.* 44(5), 598-601, 1981.
8. Consentino, S.; Tuberoso, C.L.G.; Pisano, B.; Satta, M.; Mascia, V.; Arzedi, E.; Palmas, F. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of sardinian Thymus Essential Oils *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 130-135,1999.
9. Cox S.D; Gustafson,J.E.; Mann, C.M.; Markham,J.L.; Liew, Y.C.; Hartland, R.P.; Bell, H.C.; Warmington J.R.; Wyllie,S.G. Tea tree oil cause K⁺ leakage and inhibitis respiration in *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 26,355-358,1998.
10. Cox S.D; Mann C.M.; Markham J.L.; Bell, H.C.; Gustafson, J.E.; Warmington J.R.; Wyllie S.G. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Malaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appli. Microbiol.* vol. 88(1), page 170, 2000.
11. David, H.L.; Lévy-Frébault, V.; Thorel, M.F. *Methods de Laboratoire pour Mycobacteriologie Clinique*. Institut Pasteur, Paris 1989.
- 12 Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2005. Genebra, World Health Organization (WHO/HTM/tuberculose/2005.349).

13. Girón, L.M.; Freire, V.; Alonzo, A.; Cáceres, A. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *J. Ethnopharmacol.*, 34, 173-187, 1991.
14. Helander, I. M.; Alakomi, H. L.; Kyosti, L-K.; Mattila-Sandholm, T.; Pol, I.; Smid, E.J.; Gorris, L.G.M.; Von Wright, A. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. *J. agric. Food Chem.*, 46, 3590-3595, 1998.
15. Knobloch, K.; Pauli, A.; Iberl, B.; Weis, N.; Weigand, H. Antibacterial activity and antifungal properties of essential oil components. *J. Essent. l Oils Res.*, 1, 119-128. 1988.
16. Lemos, T.L.G.; Monte, F.J.Q.; Matos F.J.A.; Alencar J.W.; Craveiro A.A.; Barbosa, R.C.S.B.; Lima, E.O. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Brazilian plants. *Fitoterapia*. 63. 266-268, 1992.
17. Matos, F.J.A.; Machado, M.I.L.; Alencar, J.W.; Matos, M.E.O.; Craveiro, A.A. Plants used in traditional medicine of China and Brazil, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 86; 13-16.1991.
- 17^a. Lorenzi, H; Matos, F.J.A. Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas. Farmacologia. Nova Odessa, São Paulo, 615p. 2002.
18. Matos, F.J.A.; Machado M.I.L.; Craveiro A.A.; Alencar, J.W.; Silva, M.G.V. Medicinal plants of northeast Brazil containing thymol and carvacrol – *Lippia sidoides* Cham. and *Lippia gracilis* H.B.K. (Verbenaceae). *J. Essent. Oil Res.* 11, 666-668, 1999.
19. Maruzzella, J.C.; Sicurella, N.A.; Antibacterial Activity of Essential Oil Vapors . *J. Amer. Pharm. Assoc*, Scientific edition. 49, 692-694, N. Y., 1960.
20. Moreira, R.R.D.; Anno, I.S., Leite, C.Q.F.; Sensitivity of Mycobacteria to different species of *Eucalyptus* L'HERIT. *Rev. de Microbiol.* 28, 256-260, 1997.
- 21 Morton C, Atlas of Medicinal Medicinal Plants of middle América, vol.I. Springfield, Illinois, USA, pp. 745-750. 1981.
- 22 Pauli, A.; Heinz S.; Specific selection of essential oil compounds for treatment of children's infection diseases. *Pharmaceuticals*, 2004, 1, 1-30.
23. Pessoa, O.D.L.; Carvalho, C.M.B.; Silvestre, J.O.V.L.; Lima, M.C.L.; Neto R.M.; Matos, F.J.A.; Lemos T.L.G. Antibacterial activity of the essential oil from *Lippia aff. gracilis*. *Fitoterapia* 76, 721-714, 2005
24. Rastogi, N. ; Abaul L.J.; Goh, K.S., Devallois A.; Philogène, E. ; Bourgeois, P. Antimycobacterial activity of chemically defined natural substances from the Caribbean flora in Guadeloupe. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 20, 267-273, 1998.
25. Sikkema, J.; de Bont, J.A.M.; Poolman, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. of Biolog. l Chem*, 269, 8022-8028. 1994.

26. Terblanché, F.C., Kornelius,G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae). A literature review. *J. Essent. Oil res.*,8 ,471-485.1996.
27. Uribe, S.; Ramirez T., Pena, A. Effects of β -pimene on yeast membrane functions. *J. Bacteriol.* , 161, 1195-1200. 1985.

Table 1- Chemical composition of *Lippia gracillis* essential oil

COMPONENTS	KI	RT	Percentage
			(%)
α -thujene	925	6.29	0.92
β -Myrcene	986	8.35	2.29
α -Terpinene	1008	9.11	0.87
p-Cymene	1022	9.57	18.91
γ -Terpinene	1053	10.64	4.22
Terpinen-4-ol	1176	14.82	0.92
Methyl thymylether	1240	16.97	2.79
Thymol	1309	19.30	7.46
Carvacrol	1331	20.05	56.36
Thymol acetate	1381	21.76	2.98
2-Hydroxymethyl-carvacrol	1492	25.50	1.68
Caryophyllene oxide	1566	28.02	0.58

KI = Kovats indexes

RT = Retention tim

Tabela 2. Comparative antimycobacterial activity of the essential oil of *Lippia gracillis* with tuberculostatic drugs

<i>M. tuberculosis</i> strains	Essential oil <i>Lippia gracillis</i>		tuberculostatics drug					
	MIC (% V/V)	PMR % ($x \pm \delta$)	PZA	EMB	ETH	INH	RPM	SM
LC01	0.31	0.64 (± 0.15)	≤ 10	≤ 1	≤ 10	≥ 1	≤ 1	≤ 10
LC02	0.31	0.67 (± 0.21)	≤ 10	≤ 1	≤ 10	≥ 1	≤ 1	≤ 10
LC03	0.31	0.35 (± 0.07)	≤ 10	≤ 1	≤ 10	≤ 1	≤ 1	≤ 10
LC04	1.24	1.55 (± 0.35)	≤ 10	≥ 1	≥ 10	≥ 1	≥ 1	≥ 10
LC05	0.31	0.07 (± 0.09)	≤ 10	≤ 1	≤ 10	≤ 1	≤ 1	≤ 10
LC06	0.31	0.66 (± 0.15)	≤ 10	≤ 1	≤ 10	≤ 1	≤ 1	≤ 10
LC07	0.25	0.60 (± 0.28)	≤ 10	≤ 1	≤ 10	≥ 1	≥ 1	≤ 10
LC08	0.31	0.64 (± 0.21)	≤ 10	≤ 1	≤ 10	≤ 1	≤ 1	≤ 10
LC09	0.31	0.35 (± 0.21)	≤ 10	≤ 1	≤ 10	≤ 1	≤ 1	≤ 10
LC10	0.62	0.76 (± 0.30)	≤ 10	≤ 1	≤ 10	≤ 1	≤ 1	≤ 10
LC11	0.31	0.78 (± 0.14)	≤ 10	≤ 1	≤ 10	≤ 1	≤ 1	≤ 10
LC12	0.62	1.50 (± 0.07)	≤ 10	≥ 1	≤ 10	≥ 1	≥ 1	≤ 10
LC13	0.15	0.44 (± 0.33)	≤ 10	≤ 1	≤ 10	≤ 1	≤ 1	≤ 10
LC14	0.31	0.66 (± 0.15)	≤ 10	≤ 1	≤ 10	≤ 1	≤ 1	≤ 10
H37Rv	0.31	0.24 (± 0.14)	≤ 10	≤ 1	≤ 10	≤ 1	≤ 1	≤ 10

MIC- minimum inhibitory concentration determined by 1% proportion method with Lowenstein-Jensen medium

PMR- proportional of the mutants resistents, **X** - média aritmética, **δ** - desvio padrão, **PZA** (pirazinamide), **EMB** (ethambutol), **ETH** (ethionamide), **INH** (isoniazid), **RPM** (rifampicin) e **SM** (streptomycin)