

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

**A IMPORTÂNCIA DE *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng COMO
ALTERNATIVA TERAPÊUTICA – MÉTODOS EXPERIMENTAIS**

ANA PAVLA ALMEIDA DINIZ GURGEL

RECIFE – PE
FEVEREIRO, 2007

ANA PAVLA ALMEIDA DINIZ GURGEL

A IMPORTÂNCIA DE *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng COMO
ALTERNATIVA TERAPÊUTICA – MÉTODOS EXPERIMENTAIS

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 a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Avaliação e Obtenção de Produtos Bioativos e Naturais.

Orientador (a): Profa. Dra. Ivone Antônia de Souza

Co-orientador (a): Profa. Dra. Rinalda Araújo Guerra de Oliveira

RECIFE – PE

FEVEREIRO, 2007

1 GURGEL, ANA PAVLA ALMEIDA DINIZ

A importância de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng como alternativa terapêutica – métodos experimentais / Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel. – Recife: O Autor, 2007.

xvii, 89 folhas : il., fig., tab., gráf., quadros.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2007.

Inclui bibliografia.

1. Farmacologia - ***Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng** . 2. ***Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng** - Toxicologia. I. Título.

615.11
615.1

CDU (2.ed.)
CDD (20.ed.)

UFPE
CCS2007-49

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

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

Pedro José Rolim Neto

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

Beate Seagesser Santos



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

Recife, 27 de fevereiro de 2007.

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 27 de fevereiro de 2007 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Profa. Dra. Ivone Antonia de Souza (Deptº de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: Ivone Souza

EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Haroudo Sátiro Xavier (Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: Haroudo Sátiro Xavier

EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Fálba Bernadete Ramos dos Anjos (Deptº de Histologia da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: Fálba Bernadete Ramos dos Anjos

“Ubi dubium ibi libertas: Onde há dúvida, há liberdade”

Provérbio Latino

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Maria de Fátima Almeida Diniz** e **Raimundo Gurgel Júnior** pelo amor concedido, por minha formação, pelo incentivo e apoio irrestrito.

Aos meus irmãos **Valéria Almeida Diniz Gurgel**, **Vanessa Almeida Diniz Gurgel** e **Anselmo Augusto Gurgel** por todo estímulo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me ajudar a concluir mais esta etapa de vida.

Aos meus pais, Maria de Fátima Almeida Diniz e Raimundo Gurgel Júnior (pelo apoio em todos os momentos e por acreditarem em mim), aos meus irmãos Valéria, Vanessa e Anselmo Gurgel (pelo incentivo e carinho).

Aos meus tios e tias, especialmente Tia Mércia, Tia Franci (*in memoriam*), Tio Aécio, Omar, Ângela e Tio Marcos, pela ajuda e incentivo.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ivone Antônia de Souza pela atenção, paciência, por todas as oportunidades ofertadas, por todas as caronas (de alto risco), pela orientação, ensinamentos e por ser, além de tudo, minha amiga.

À minha Co-orientadora Rinalda Araújo Guerra de Oliveira pela paciência, pelas oportunidades oferecidas, pelo carinho e, principalmente, por ser para mim um exemplo de dedicação.

À Jackeline Gomes da Silva, pela paciência, convivência (exceto ao acordar), pelo apoio, pela parceria de estudo e trabalho, pelas horas de descontração, por tentar sempre me ajudar e, principalmente, pela sua amizade.

Aos meus Co-orientadores não oficiais Maria Angélica Ramos da Silva e Aldo César Passilongo da Silva, pela ajuda irrestrita, pela amizade, carinho e, sobretudo, pela paciência comigo.

À Profa. Dra. Maria do Socorro Vieira Pereira, pelo apoio ofertado para a conclusão de uma das etapas deste trabalho.

Ao Prof Dr. Haroudo Sátiro Xavier, por me ajudar na avaliação do perfil fitoquímico.

À Profa. Dra. Fálba Bernadete dos Anjos pela ajuda na área histopatológica.

Ao Prof. Msc. Alex Benício, pela ajuda na parte histológica e pelas brincadeiras.

À Ruth Sampaio (vixe mainha), Cynthia Pontes de Lima (piloereções), Aldo César (o poderoso chefe ou Batman) e Daniella Pontes pelas ajuda no laboratório e pelas horas de descontração e diversão.

À equipe do laboratório de Cancerologia Experimental Danielli, Renato, Rômulo, Laurimar, Elisângella, Sérgio e Isla, pela ajuda nos finais de semana e pela convivência.

A todos os meus colegas de turma, especialmente a Antonieta, Osman, Pablo, Henrique e José Guedes.

Aos meus amigos Rodrigo, Camila, Paloma, Telton, André, Rubens, Josenilson, Micheline, Glécia, Júlia, Luana, Suênia, Fabianna Alencar, Deivid e Mariana.

À Fabíolla Alencar e Heloísa Queiroz, pela amizade, carinho, incentivo, e por estarem do meu lado nos bons e nos maus momentos.

À Rosinha, Marquinhos e D'julie pela atenção comigo.

A todas as minhas colegas de pensionato Norma, Cristiane, Synara, Magda, Lúcia, Manu, Jana, Clarisse, Lariza e Raísse.

Às instituições Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela cooperação financeira.

A todos os amigos que contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS		xi
LISTA DE TABELAS		xii
LISTA DE QUADROS		xiii
LISTA DE GRÁFICOS		xiv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS		xv
RESUMO		xvi
ABSTRACT		xvii
1	INTRODUÇÃO	1
1.1	A Fitoterapia e a Política Nacional	2
1.2	Perspectivas das Plantas Medicinais	3
1.3	Importância dos Estudos Farmacológicos de Plantas medicinais	5
1.4	Toxicologia de Plantas Medicinais no Brasil	5
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1	<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng	8
2.1.1	Aspectos Botânicos	8
2.1.2	Aspectos Químicos	10
2.1.3	Estudos Enobotânicos e Farmacológicos	12
2.1.4	Estudos Toxicológicos de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng	14
3.	OBJETIVO	
3.1	Objetivo geral	16
3.2	Objetivos específicos	16
4.	ARTIGO I: Screening antimicrobiano e triagem fitoquímica do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng (Lamiaceae)	18
	Resumo	18
	Abstract	19
	Introdução	19
	Material e Métodos	20
	Resultados e Discussão	22
	Conclusões	24
	Referências	25
5.	ARTIGO II: Atividade antibacteriana e curva de mortalidade do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng (Lamiaceae) em cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	33
	Resumo	33
	Abstract	34
	Introdução	34
	Material e Métodos	35

	Resultados e Discussão	37
	Conclusões	39
	Referências	39
6.	ARTIGO III: Avaliação da toxicidade aguda e atividade antiinflamatória do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng (Lamiaceae)	47
	Resumo	47
	Abstract	47
	Introdução	48
	Material e Métodos	49
	Resultados	51
	Discussão	52
	Referências	55
7.	ARTIGO IV: Atividade antineoplásica e carcinogênica do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng (Lamiaceae) nos modelos de Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich	63
	Resumo	63
	Abstract	64
	Introdução	64
	Material e Métodos	66
	Resultados e Discussão	67
	Referências	70
8.	CONCLUSÕES	76
9.	REFERÊNCIAS	78

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Aspectos gerais das folhas de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng 9
- Figura 2: Aspectos gerais de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng 9
- Figura 3: Percentagem (%) da ação antiedematogênica, na terceira hora após a administração do EH das folhas de *P. amboinicus* (150, 250 e 350 mg.kg⁻¹), por via intraperitoneal, no modelo de pata induzido por carragenina em ratas Wistar adultas. 58
- Figura 4: Percentagem (%) da ação antiedematogênica, na sexta hora após a administração do EH das folhas de *P. amboinicus* (150, 250 e 350 mg.kg⁻¹), por via intraperitoneal, no modelo de pata induzido por carragenina em ratas Wistar adultas. 58
- Figura 5: Percentagem (%) de inibição do EH das folhas de *P. amboinicus*, administrados por via intraperitoneal, sobre o modelo experimental de Sarcoma 180 em camundongos fêmeas adultas 73
- Figura 6: Percentagem (%) de inibição do EH das folhas de *P. amboinicus*, administrados por via intraperitoneal, sobre o modelo experimental de Carcinoma de Ehrlich em camundongos fêmeas adultas 73
- Figura 7: Percentagem (%) de crescimento do EH das folhas de *P. amboinicus*, administrados por via intraperitoneal, sobre o modelo experimental de Carcinoma de Ehrlich em camundongos fêmeas adultas. 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Metabólitos secundários encontrados no EH das folhas de <i>P. amboinicus</i>	30
Tabela 2:	Média dos diâmetros de halos de inibição (em mm) da atividade antibacteriana do EH das folhas de <i>P. amboinicus</i>	31
Tabela 3:	Concentração inibitória mínima do EH das folhas de <i>P. amboinicus</i> frente aos microrganismos <i>S. aureus</i> MRSA.	43
Tabela 4:	Efeitos farmacológicos dos ensaios preliminares de toxicidade do EH das folhas de <i>P. amboinicus</i>	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Classificação sistemática de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng	10
Quadro 2:	Sistemas cromatográficos utilizados para a caracterização fitoquímica do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng	29

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1:	Média dos halos de inibição do extrato hidroalcoólico de <i>P. amboinicus</i> em linhagens <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	43
Gráfico 2:	Curva de ação bacteriostática do extrato hidroalcoólico de <i>P. amboinicus</i> na amostra de ATCC 6538 <i>S. aureus</i> MRSA	44
Gráfico 3:	Curva de ação bacteriostática do extrato hidroalcoólico de <i>P. amboinicus</i> na amostra de ATCC 6538 <i>S. aureus</i> MRSA	44
Gráfico 4:	Curva de ação bacteriostática do extrato hidroalcoólico de <i>P. amboinicus</i> na amostra de ATCC 10 CC <i>S. aureus</i> MRSA	45
Gráfico 5:	Curva de ação bacteriostática do extrato hidroalcoólico de <i>P. amboinicus</i> na amostra de 171 C de <i>S. aureus</i> MRSA	45
Gráfico 6:	Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>P. amboinicus</i> nas doses de 150, 250 e 350 mg.kg ⁻¹ , administrados por via oral, no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratas Wister adultas	59
Gráfico 7:	Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>P. amboinicus</i> nas doses de 150, 250 e 350 mg.kg ⁻¹ , administrados por via oral, no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratas Wister adultas	60

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Percentagem

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – American Type Culture Collection

CIM – Concentração inibitória mínima

COX-2 – Cicloxigenase tipo 2

DL₅₀- Dose letal para 50% da população

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EH – Extrato hidroalcoólico

i.p – Via intraperitoneal

IPA – Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária

LTF – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica

MRSA – Staphylococcus aureus Resistentes a Meticilina

NCCLS – National Committee on Clinical Laboratory Standards

NO – Oxido Nitroso

PLA₂ – Fosfolipase A₂

SNC – Sistema Nervoso Central

SNA – Sistema Nervoso Autônomo

TBARPs – Ácido Tiobarbitúrico

v.o – Via oral

v/v – Volume por volume

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

mg – Miligramas

kg – Kilograma

°C – Graus Celsius

RESUMO

GURGEL, A. P. A. D. A importância de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng como alternativa terapêutica – Métodos Experimentais. Dissertação em Ciências Farmacêuticas/UFPE. Recife, 2007.

Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng (Lamiaceae) é uma planta herbácea nativa da Ásia Oriental e encontra-se distribuída por toda a América. No Brasil, é conhecida como hortelã da folha grossa, hortelã da folha graúda, malvariço e mundialmente como orégano, sendo utilizada popularmente como analgésica, antiinflamatória e antimicrobiana. Esta pesquisa avaliou o perfil fitoquímico e as ações toxicológicas, microbiológicas e farmacológicas (atividade antineoplásica e antiinflamatória, em roedores) do resíduo do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. amboinicus*. No estudo fitoquímico constatou-se a presença de flavonóides (quercetina e luteolina, rutina), terpenos, derivados cinâmicos, monoterpenos (carvacrol, timol), triterpenos (β – sitosterol e β – amirina) e esteróides. No ensaio de toxicidade aguda do extrato foram verificadas reações estimulantes seguida por reações depressoras sobre Sistema Nervoso Central. Não houve óbitos em nenhuma das doses testadas (a maior dose 3.800 mg.kg^{-1} por via intraperitoneal e 4.000 mg.kg^{-1} por via oral) descartando uma possível DL_{50} . Nos ensaios microbiológicos foi verificado uma forte ação antimicrobiana do extrato em bactérias gram-positivas, principalmente *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (MRSA), onde a concentração inibitória mínima oscilou entre 18.7 e 9.3 mg.ml^{-1} do referido extrato. A ação do extrato sobre a cinética bacteriana (curva de mortalidade) sugere uma ação tanto bactericida como bacteriostática, variando conforme concentração do extrato. Em bactérias gram-negativas e fungos leveduriformes não foram constatadas ações do extrato. Para a atividade antiinflamatória utilizou-se o modelo do edema de pata induzido por carragenina. Foram administradas as doses crescente de 150 , 250 e 350 mg.kg^{-1} do extrato por via oral e intraperitoneal. Nos ensaios antiinflamatórios por via oral não foram observados diminuições nos edemas, porém, nas administrações intraperitoneais, foram verificadas diminuições significativas do edema em todas as doses testadas. Nos ensaios de atividade antineoplásica, foram utilizados os modelos experimentais de Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich. Nos grupos tratados com o extrato foram averiguadas diminuições na média dos pesos dos tumores em todas as doses administradas por via intraperitoneal (100 , 150 , 250 e 350 mg.kg^{-1}), exceto na dose 350 mg.kg^{-1} , no modelo de Carcinoma de Ehrlich, que apresentou uma ação carcinogênica.

Palavras-chave: *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, perfil fitoquímico, toxicidade aguda, atividade antimicrobiana, cinética bacteriana, atividade antiinflamatória, atividade antineoplásica.

ABSTRACT

GURGEL, A. P. A. D. The importance of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng as therapeutical alternative - Experimental Methods. Dissertation in Pharmaceutical Science/UFPE. Recife, 2007.

Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng (Lamiaceae) is a native herbaceous plant of Eastern Asia and meets distributed by all America. In Brazil, it is known as “hortelã da folha grossa”, “hortelã da folha graúda”, “malvariço” and world-wide as oregano, being used popularly as analgesic, anti-inflammatory and antimicrobials. This research evaluated the phytochemical profile and the toxicological, microbiological and pharmacological actions (antineoplastic and anti-inflammatory activity in rodents) of the residue of the hydroalcoholic extracts of leaves of *P. amboinicus*. In the phytochemical study was evidenced presence of flavonoids (quercetin, luteolin and rutin), terpenes, cinnamic derivatives, monoterpenes (carvacrol and thymol), triterpenes (β - sitosterol and β - amirina) and steroids. In the assay of acute toxicity of the extract it was verified stimulants reactions followed by depressive reactions on Central Nervous System. It did not have deaths in none of the tested concentrations (great concentration 3.800 mg.kg^{-1} intraperitoneal and 4.000 mg.kg^{-1} , by oral form) discarding a possible DL_{50} . In the microbiological assays was verified one strong antimicrobial action of the extract in gram-positive bacteria, mainly *Staphylococcus aureus* Methicillin resistant (MRSA), where the minimum inhibitory concentration oscillated between 18.7 and 9.3 mg.ml^{-1} of related extract. The action of times-kill curves bacterial of extract suggests an action bactericidal and bacteriostatic, varying as concentration of the extract. In gram-negative bacteria and fungi not been evidenced action of the extract. In inflammation models, the paw edema in rats was induced by subcutaneous injection of carrageenan. The anti-inflammatory tests by oral administration did not considerably reduce the volumes of rat paw edema (150, 250 and 350 mg.kg^{-1}) as shown by the intraperitoneal injection which significantly inhibited the final phase of the inflammation. In the assays of antineoplastic activity, the experimental models of Sarcoma 180 and Carcinoma of Ehrlich had been used. In the groups dealt with the hydroalcoholic extract of leaves of *P. amboinicus* had presented reductions in the average of the weights of the tumors in all the concentrations by intraperitoneal administration (100, 150, 250 and 350 mg.kg^{-1}), except in 350 dose mg.kg^{-1} , in the model of Carcinoma of Ehrlich, that presented a carcinogenic action.

Key-words: *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, phytochemical profile, acute toxicity, antimicrobial activity, times-kill curves bacterial, anti-inflammatory activity, antineoplastic activity.



1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 A FITOTERAPIA E A POLÍTICA NACIONAL

O uso de espécies vegetais com fins de tratamento e cura de doenças remonta ao início da hominização, desde o momento em que os primeiros hominídeos começaram o longo percurso de manuseio, adaptação e modificação dos recursos naturais para seu próprio benefício. Desde a pré-história o homem já utilizava as plantas tanto para fins alimentícios quanto para fins medicinais. Esta prática milenar, documentada em vários escritos antigos como os Vedas, o Livro Sagrado Indiano, e no Grande Livro das Ervas, publicado pelos chineses, ultrapassou todas as barreiras e obstáculos durante o processo evolutivo, chegando até os dias atuais, sendo amplamente utilizada por grande parte da população mundial como fonte de recurso terapêutico eficaz (CARRAZONI, 2000; FREITAS, 2006).

No século XX, o surgimento dos antibióticos produzidos por fermentação microbiana aliado ao desenvolvimento marcante de fármacos sintéticos produzidos pela indústria farmacêutica, logo depois da II Grande Guerra, foram causas marcantes do declínio do uso de plantas medicinais e, subsequentemente, do investimento de fármacos de origem vegetal (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Porém, hoje a fitoterapia está renascendo à luz da ciência moderna, despertando maior interesse dos países economicamente mais pobres, onde o consumo é crescente representando às vezes a única alternativa terapêutica, e também dos países ricos industrializados, que suportam grande parte dos elevados custos subsidiados de medicamentos às suas populações, e buscam na fitoterapia mais uma alternativa econômica (CALIXTO, 2000).

O segmento de fitoterápicos movimenta anualmente no mundo cerca de US\$ 22 bilhões, com crescimento de 12% ao ano. Só no ano de 2000, o setor faturou cerca de US\$ 6,6 bilhões nos Estados Unidos e US\$ 8,5 bilhões na Europa, sendo a Alemanha e os Estados Unidos os maiores mercados de fitoterápicos. No Brasil, considera-se que as vendas neste setor crescem 10% ao ano, com estimativas de terem alcançado a cifra de US\$ 550 milhões no ano de 2001 (PINTO et al, 2002; BRASIL, 2006a).

Além da importância em escala industrial, as plantas medicinais são utilizadas em pesquisas farmacológicas para o desenvolvimento de drogas, não somente como agente terapêutico direto, mas também servindo de matéria-prima para a síntese ou modelos de compostos farmacologicamente ativos (BRASIL, 2006a).

O Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta que, associada a uma rica diversidade étnica e cultural, detém um valioso conhecimento social associado ao uso de plantas medicinais, tendo assim um potencial necessário para o desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e

terapêuticas apropriadas (BRASIL, 2006a). Além disso, estima-se que cerca de cinquenta milhões de brasileiros não tem acesso ao medicamento, o que justifica a adoção de medidas que visem à amplificação das pesquisas e propiciem o uso seguro de plantas medicinais como alternativa terapêutica em todo o país, com especial atenção às regiões mais pobres (DINIZ, 2000).

Com base nisso, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos foi aprovada por meio do Decreto N° 5.813 de 22 de Junho de 2006, estabelecendo diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações em torno de objetivos comuns voltados à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil, incentivando o desenvolvimento de tecnologias e o uso sustentável da biodiversidade brasileira (BRASIL, 2006a).

Ainda em 2006 a Portaria n° 971, aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. A Fitoterapia está inserida nestas práticas integrativas e foi aprovada através do Decreto n° 5.813, de 22 de junho de 2006 (BRASIL, 2006b).

1.2 PERSPECTIVAS DAS PLANTAS MEDICINAIS

1.2.1 MICROMOLÉCULAS DE PLANTAS

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Dentre os diversos reinos da natureza, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamento, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PINTO et al, 2002).

Muitas dessas substâncias constituem-se, sobretudo, em modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos modernos, tais como procaína, cloroquina, tropicamida, ou de fármacos imprescindíveis como Vimblastina (Velban®), Vincristina (Oncovin®), podofilotoxinas e análogos etoposídeos (VP- 16- 213, Vepeside®), e teniposídeo (VM – 26, Vumon®), camptotecina e taxol (plaxitaxel; Taxol®). O mercado destes fármacos movimenta cerca de U\$S 50 bilhões, justificando a busca de novas substâncias bioativas e reativando o interesse pelos medicamentos de origem vegetal, principalmente pela busca de substâncias com estruturas moleculares complexas, praticamente impossíveis de serem obtidas no processo sintético de custo racional. (MONTANARI; BOLZANI, 2001; PINTO et al, 2002).

1.2.2 PLANTAS MEDICINAIS NA ERA GENÔMICA

O seqüenciamento do genoma de *Arabidopsis thaliana*, primeira espécie vegetal a ter seu código genético completamente decifrado, dá início uma nova fase na pesquisa sobre biologia molecular de plantas e principalmente sobre o conhecimento de genes de regulação metabólica. A possibilidade de se utilizar genes regulatórios e suas associações foi demonstrada pela ativação e produção de antocianinas em células de *Arabidopsis* e de milho, que se processam por ativação de transcriptomas. Recentemente, o trabalho sobre a biossíntese de alcalóides indólicos em *Catharanthus roseus* resultou no isolamento de genes regulatórios, relevante para a compreensão da relação gene/metabolismo secundário em relação à variação da concentração e diversificação dos metabólitos, que possivelmente estão relacionados com determinadas funções enzimáticas (PINTO et al, 2002).

Trabalhos envolvendo melhoramento genético de plantas medicinais ainda são incipientes. Porém, deve-se ressaltar o melhoramento da *Chamomilla recutita* (camomila), desenvolvido no Paraná, que mostrou um teor superior em produtividade de óleo essencial e da *Artemisia annua* (Artemísia), que incrementou significativamente a produção do antimalárico artemisinina, passando de 5kg/ha para 25 kg/ha de artemisinina (MAGALHÃES, 1998 apud OLIVEIRA et al, 2000).

Com a facilidade de hibridização de algumas plantas medicinais, seu cultivo se torna mais interessante a fim de obter material adaptado aos mais diferentes locais. Isto ocorre com espécies do gênero *Mentha* e *Ocimum*, pois nas espécies que compõem estes gêneros não ocorrem barreiras muito rígidas ao cruzamento interespecífico, gerando variabilidade que pode ser selecionada, e a propagação pode ser feita assexuadamente (SOBTI, 1982 apud OLIVEIRA et al, 2000).

1.3 IMPORTÂNCIA DOS ESTUDOS FARMACOLÓGICOS DE PLANTAS MEDICINAIS

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, etc, tem sido objeto de incessantes estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais. Muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de futuramente virem a ser aproveitadas como agentes medicinais. Entre os diversos exemplos de substâncias oriundas de plantas e de importância atualmente, podemos mencionar a forskolina, obtida de *Coleus barbatus*, que apresenta efeitos contra hipertensão, glaucoma, asma e certos tumores, a artemisinina, presente em *Artemisia annua*, que exerce potente atividade antimalárica, e o diterpeno anticancerígeno taxol, isolado de plantas do gênero *Taxus*, que após sua síntese em escala industrial, já se encontra disponível no

mercado farmacêutico, constituindo-se numa grande esperança para pessoas portadoras de câncer nos ovários e pulmões (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998).

A elucidação destes componentes ativos presentes nas plantas bem como seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e farmacologia. As plantas contêm inúmeros constituintes e seus extratos, quando testados, podem apresentar efeito sinérgico entre os diferentes princípios ativos devido à presença de componentes de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade. No estudo da atividade biológica de extratos vegetais é importante a seleção de bioensaios para a detecção do efeito específico. Os sistemas de ensaios devem ser simples, sensíveis e reprodutíveis (MACIEL et al, 2002).

1.4 TOXICOLOGIA DE PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários e comerciantes. Muitas vezes essas plantações são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas (VEIGA-JÚNIOR et al, 2005).

A toxicidade de plantas medicinais é um problema sério e de saúde pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações e toxidez, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente. As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais pelas feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (VEIGA-JÚNIOR et al, 2005).

Com base nisso, em 2004 a Resolução nº 90, da ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária publicou um “GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS” com objetivo de normatizar métodos padronizados para os estudos de toxicologia pré-clínica no Brasil (BRASIL, 2004).



2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Plectranthus amboinicus* Lour. Spreng

2.1.1 ASPECTOS BOTÂNICOS

A família Lamiales compreende mais de 220 gêneros e cerca de 4.000 espécies, sendo considerada uma das mais importantes famílias do ponto de vista econômico e etnobotânico. Muitas de suas espécies são cultivadas para fins medicinais (*Ocimum* e *Mentha*), ornamentais, no condimento, alimentação (*Plectranthus*, *Origanum*) e como alucinógeno (*Salvia*) (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 1998).

O gênero *Plectranthus* pertence à subfamília Nepetoideae e à tribo Ocimae, contendo cerca de 300 espécies fitogeograficamente distribuídas na África, América, Ásia e Austrália. As espécies deste gênero são frequentemente utilizadas na alimentação e no tratamento de patologias digestivas, respiratórias, infectivas e de pele (LUKHOBBA et al, 2005).

A espécie *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (figuras 1 e 2) possui vários sinônimos, tais como *Plectranthus aromaticus* Roxb., *Coleus aromaticus* Benth. e *Coleus amboinicus* Lour. Popularmente é conhecida como hortelã da folha grossa, hortelã da folha graúda, malvariço, orégano e orégano francês. A espécie é nativa da Ásia Oriental e encontra-se distribuída por toda a América (ACOSTA et al, 1998; ABDEL-MOGIB et al 2002; LUKHOBBA et al, 2005).

P. amboinicus é uma planta herbácea, perene, suculenta, aromática, medindo cerca de 1 metro de altura. Caule quebradiço com folhas suculentas de forma ovalada, ápice agudo ou obtuso, bordos dentados e pecíolo grosso. As flores são violáceas, agrupadas em verticilos que formam espigas terminais, portando um forte odor característico da espécie (ACOSTA et al, 1998; CASTILLO; GONZALÉZ, 1999). No Brasil as flores são de cor azul e o seu período de floração é muito raro.

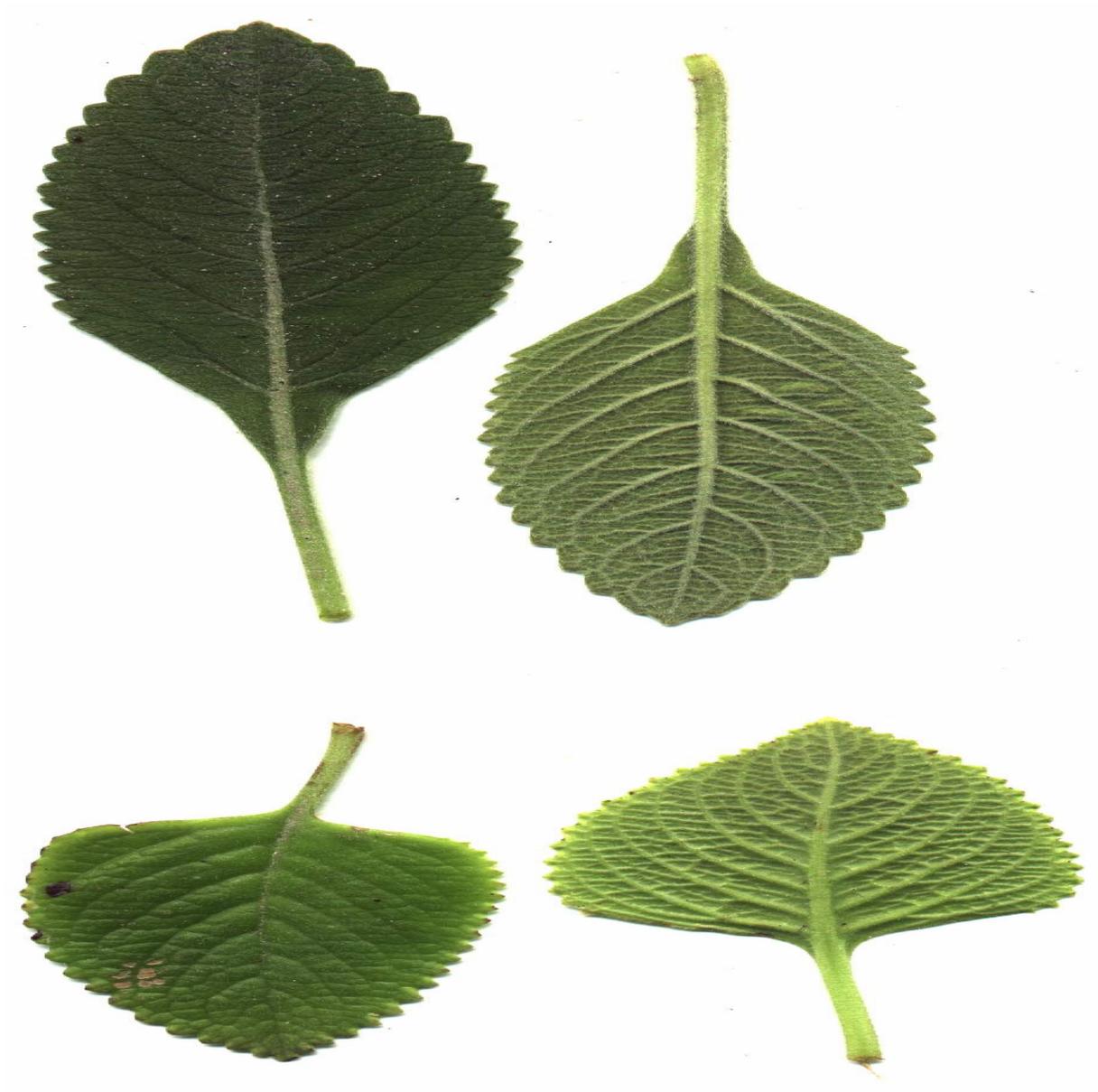


Figura 1- Aspectos gerais das folhas de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng
Hortelã da folha grossa. Fonte: Aguiar, 2004



Figura 2- *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng - Aspectos Gerais
Hortelã da folha grossa. Fonte: Aguiar, 2004

Quadro 1 - Classificação sistemática de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng

REINO	Plantae
DIVISÃO	Magnoliophyta
CLASSE	Magnoliopsida
SUB CLASSE	Asteridae
ORDEM	Lamiales
TRIBO	Ocimae
FAMÍLIA	Lamiaceae
SUBFAMÍLIA	Nepetoidea
GÊNERO	<i>Plectranthus</i>
ESPÉCIE	<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng

(CRONQUIST, 1981)

2.1.2 ASPECTOS QUÍMICOS

A maioria dos estudos fitoquímicos das espécies do gênero *Plectranthus* são focadas no isolamento de diterpenóides e suas propriedades farmacológicas. Monoterpenoides, diterpenóides sesquiterpenóides, e compostos fenólicos são comumente encontrados no gênero *Plectranthus*, sendo os diterpenóides os metabólitos secundários mais encontrados em todo o gênero. O Ácido caféico e o ácido clorogênico sempre estão presentes na família Lamiaceae, sendo ácido clorogênico considerado como de ocorrência universal na família e o ácido rosmarínico de ocorrência restrita apenas à subfamília Nepetoideae. O gênero *Plectranthus* também possui uma composição rica em óleos essenciais (ABDEL-MOGIB et al, 2002; LUKHOBA et al, 2005).

A espécie *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng possui uma composição química rica em flavonóides como apigenina, crysoeriol, cirsimarítina, luteolina quercetina, salvigenina, taxifolina. Além de flavonóides, foram detectados nas folhas açúcares redutores, ácidos triterpênicos, taninos, grupos aminos e esteróides triterpênicos (PARRA; RUIZ, 1999; CASTILLO; GONZALÉZ, 1999).

O óleo essencial de *P. amboinicus* possui uma composição rica em mono e sesquiterpenos. Já foi relatada a presença de carvacrol, timol, eugenol, metil chavicol, 1,8-cineol e outros. Em muitos estudos, o componente de maior concentração é o carvacrol, variando de 40 a 65% (PARRA; RUIZ, 1999). No entanto, Singh et al, 2002 encontrou um percentual superior a 94% de timol nas folhas de *P. amboinicus* cultivadas na Índia. A aparente discrepância com relação à concentração química do óleo essencial desta espécie deve estar correlacionada às diferenças genéticas e ambientais.

Já foram relatadas a presença de vitaminas B-1 (tiamina), B-2 (Riboflavina) e vitamina C (ácido ascórbico) nas espécies de *P. amboinicus* cultivadas no México (MORTON, 1992 apud CASTILLO; GONZALÉZ, 1999).

2.1.3 ESTUDOS ETNOBOTÂNICOS E FARMACOLÓGICOS

As espécies do gênero *Plectranthus* são frequentemente utilizadas na alimentação e no tratamento de problemas digestivos, de pele e infecções, principalmente do trato respiratório (LUKHOBBA et al, 2005).

Plectranthus amboinicus (Lour.) é popularmente utilizada no tratamento de doenças do trato respiratório, agindo como um broncodilatador, expectorante, antitussígeno e antimicrobiano, esta última propriedade confere-lhe uma ação eficaz no combate a infecções respiratórias e otites (NOGUEIRA, 2004). *P. amboinicus* é utilizado no combate à cólera, nas doenças genito-urinárias, em dores e febres. O extrato aquoso das partes aéreas de *P. amboinicus* é usado popularmente como um antiepilético, anticonvulsivante, antiasmático e em doenças gástricas (CASTILLO; GONZALES, 1999).

No Brasil, as folhas de *P. amboinicus* são utilizadas no tratamento contra dor de ouvido, dor de cabeça, inflamação no colo do útero, febre e bronquite, furúnculos, impingens e leishmaniose cutânea (MATOS, 2002).

Vários estudos científicos realizados com a planta demonstraram as atividades inseticidas, antimicrobianas, contra *Pseudomonas aeruginosas*, *Echerichia coli*, atividade antiviral contra Herpes, além de um fator de inibição da protease do HIV (NAPRALERT, 2003)

O extrato bruto das folhas de *P. amboinicus* apresentou uma ação antibacteriana sobre cepas de *S. aureus*, isoladas de pacientes portadores de otite externa (NOGUEIRA, 2004). Outros estudos demonstram que o óleo essencial de *P. amboinicus* associado a outros componentes como flavonas, ácidos aromáticos e taninos apresentam ação antibacteriana contra *Pneumococcus* e *Staphylococcus* e, quando testadas em associações com antibióticos de largo uso medicinal, demonstraram um sinergismo entre o composto vegetal e o sintético (SIEGRIST, 1986; OLIVEIRA, 2006).

O extrato aquoso e fluido das folhas de *P. amboinicus* apresentou um amplo espectro de atividade antimicrobiana tanto em bactérias gram-positivas como em gram-negativas (CASTILLO; GONZALÉZ, 1999).

O óleo essencial das folhas *P. amboinicus* extraídos de cultivares da Índia apresentou um alto percentual de timol com uma forte ação inseticida em cupins (*Odontotermes obesus* Rhamb) que estão associados às pestes de cana de açúcar (SINGH et al, 2002).

Extratos fluidos e os flavanóides de *P. amboinicus* demonstraram um efeito antioxidante em modelos de peroxidação lipídica do tecido cerebral, com a inibição de TBARPs (Ácido Tiobarbitúrico)

superior ao bioantioxidante universalmente reconhecido α -tocoferol. Estes resultados podem estar relacionados com as propriedades antiepilépticas que a espécie referida possui (SALMÁN et al, 1996).

O estudo do perfil neurofarmacológico de *P. amboinicus* demonstrou um efeito potencializador em estereotípias induzidas por anfetamina (RODRÍGUEZ, 1999). Em outro estudo, o extrato aquoso de *P. amboinicus* mostrou efeitos de inibição da recaptação intraneuronal das catecolaminas em diferentes estimulações elétricas em ratos. Tais efeitos sugerem uma ação inibitória dos mecanismos de inativação das catecolaminas, similar as das drogas antidepressivas (VILLATE et al, 1999).

Em administrações agudas do extrato aquoso liofilizado de *P. amboinicus* não foram evidenciados os efeitos anticonvulsivantes, no entanto, em administrações crônicas observou-se um efeito protetor contra as convulsões induzidas por lindocaína, sendo provável um efeito antiepiléptico da planta (BU WONG et al, 1997).

O efeito antitussígeno do extrato fluido elaborado com etanol a 30%, foi comprovado em estudo comparativo frente à codeína (20mg.kg) no modelo experimental de aerosol de amoníaco em cobaias (CIDEM, 1990 apud CASTILLO; GONZALÉZ, 1999).

Foi demonstrado um efeito modulador das folhas de *P. amboinicus* em nefrolitíase induzidas por etileno glicol em ratos, com a diminuição significativa de cálcio, oxalato e proteínas totais (ALVIN; IBRAHIM, 2005).

Uawonggul et al, (2006) relatou que o extrato de *P. amboinicus* pode ser considerado um anticorpo contra o veneno de escorpião *Heterometrus laoticus*, com eficiência de cerca de 40% em fibroblastos tratados com o veneno.

2.1.4 ESTUDOS TOXICOLÓGICOS DE *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng

O ensaio de toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico com as folhas *P. amboinicus* cultivadas em Cuba não apresentou mortalidade em ratos Wister fêmeas. O estudo toxicológico sub-agudo demonstrou que os parâmetros hematológicos e sorológicos se mantiveram em níveis normais após a administração das doses de *P. amboinicus*. Em observações macroscópicas e microscópicas dos órgãos analisados não foi relatado nenhuma alteração significativa. (CASTILLO; GONZALÉZ, 1999) Porém, Chang et al, (2005) relatou que administrações crônicas de *P. amboinicus* em humanos pode desencadear uma dermatite alérgica de contato.

Parra et al, (2001) demonstrou que o extrato metanólico das folhas de *P. amboinicus* apresentou pouca toxicidade em estudo de toxicidade aguda *in vivo*, com camundongos, e em estudo *in vitro*, com artemia salina.

Os estudos toxicogenéticos do extrato fluido e do óleo essencial, em sistemas *in vitro* e *in vivo*, apresentaram uma ação citotóxica e genotóxica significativa dose-dependente no ensaio de segregação somática frente ao fungo *Aspergillus nidulans* D-30, porém não apresentaram este mesmo efeito no ensaio de indução de micronúcleos da medula óssea de ratos (PARRA; RUIZ, 1999).



3. OBJETIVOS

3.1 OBEJTIVO GERAL

Avaliar as ações farmacológicas, microbiológicas e toxicológicas do extrato hidroalcoólico das folhas da espécie *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Avaliar o perfil fitoquímico do extrato hidroalcoólico das folhas de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng;
- 2 Analisar o screening antimicrobiano do extrato hidroalcoólico das folhas de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, em bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos leveduriformes;
- 3 Avaliar a ação antibacteriana, a concentração inibitória mínima e a cinética bacteriana do extrato hidroalcoólico das folhas de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, frente às cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes (MRSA);
- 4 Avaliar a toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico das folhas de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, através da determinação da dose letal para 50% da população DL₅₀;
- 5 Avaliar a atividade antiinflamatória do extrato hidroalcoólico das folhas de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng;
- 6 Avaliar a atividade antineoplásica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.



4. *ARTIGO I*

Screening Antimicrobiano e Triagem Fitoquímica do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae)

Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel ^{1*}, Haroudo Sátiro Xavier ¹, Rinalda Araújo Guerra de Oliveira ², Maria do Socorro Vieira Pereira ³, Ivone Antônia de Souza ⁴

1 Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-521, Recife, PE, Brasil,

2 Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Federal da Paraíba, Av. Castelo Branco, S/N, Cidade Universitária 58051-900, João Pessoa, PB, Brasil,

3 Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, Av. Castelo Branco, S/N, Cidade Universitária 58051-900, João Pessoa, PB, Brasil,

4 Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Arthur de Sá, S/N, Cidade Universitária, 50740-521, Recife, PE, Brasil.

RESUMO “Screening antimicrobiano e triagem fitoquímica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Plectranthus amboinicus* Lour. Spreng (Lamiaceae)”. *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng é uma espécie nativa da Ásia Oriental e distribuída por toda a América. A planta é conhecida mundialmente como hortelã da folha graúda e orégano, sendo comumente utilizada na medicina popular como antimicótico, antiinflamatório, analgésico e nas infecções respiratórias. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e a triagem fitoquímica do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. amboinicus* em fungos do gênero *Cândida*, bactérias gram-positivas e gram-negativas. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em meio sólido. As análises fitoquímicas detectaram a presença de terpenos, flavonóides, derivados cinâmicos, carvacrol e timol. De acordo com os resultados, o extrato hidroalcoólico das folhas de *P. amboinicus* mostrou uma potente atividade contra bactérias gram-positivas, porém, não houve inibição do crescimento em bactérias gram-negativas e fungos leveduriformes, contrariando outros estudos. Portanto, o extrato hidroalcoólico das folhas de *P. amboinicus*, apresenta uma considerável atividade antibacteriana sobre linhagens gram-positivas, constituindo um meio alternativo na terapêutica de *S. aureus*.

Unitermos: *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng; Atividade Antimicrobiana; Triagem Fitoquímica.

ABSTRACT “Antimicrobial screening and phytochemical analysis of hidroalcoólico extract of leaves *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng. (Lamiaceae)”. *Plectranthus amboinicus* is a native species of Asia Eastern and distributed by all America. The plant is known popularly as “hortelã da folha graúda” and oregano, being commonly used in the folk medicine as antimycotic, anti-

inflammatory, analgesic and in the respiratory infections. The objective of this work was to evaluate the antimicrobial activity and the phytochemical analysis of the hydroalcoholic extracts of leaves of *P. amboinicus* in *Cândida* genus yeasts, gram-positive and gram-negative bacteria. The antimicrobial activity was determined by the method of diffusion in agar. The phytochemical analyses detected the presence of terpenes, flavonoids, cinnamic derivatives, carvacrol and thymol. In accordance with the results, the hydroalcoholic extracts of leaves of *P. amboinicus* showed a powerful activity against gram-positive bacterial, however, did not have inhibition of the growth in gram-negative bacterial and yeasts, opposing other studies. Therefore, the hydroalcoholic extracts of leaves of *P. amboinicus*, presents a considerable antibacterial activity on gram-positive, constituting an alternative way in therapeutical of *S. aureus*.

Key-words: *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, Antimicrobial Activity; Phytochemical Analysis.

INTRODUÇÃO

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, sesquiterpenos, triterpenos, taninos, iridóides, entre outros, tem sido objeto de incessantes estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais. Muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de futuramente virem a ser aproveitadas como agentes medicinais. Entre os diversos exemplos de substâncias oriundas de plantas e de importância atualmente, podemos mencionar a forskolina, obtida de *Plectranthus barbatus*, que apresenta promissores efeitos contra hipertensão, glaucoma, asma e certos tumores (Chechinell-Filho; Yunes, 1998).

O gênero *Plectranthus* encerra várias espécies que são comumente utilizadas na medicina popular em várias partes do mundo. Estudos fitoquímicos prévios mostram que diterpenos e triterpenos são os metabólitos mais comuns do gênero, sendo responsáveis por variadas e importantes propriedades medicinais como antivirais, antifúngicos, anti-hipertensivo, entre outras (Abdel-Mogib et al., 2002).

Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng, é nativa da Ásia, distribuída por toda a América e possui uma composição química rica em óleos essenciais (com a presença de timol, carvacrol), flavanóides e taninos, todos estes compostos com conhecida ação antimicrobiana. Investigações

farmacológicas prévias mostraram que *P. amboinicus* possui propriedades genotóxicas (Parra; Ruiz, 1999), antiepiléptica (Sálman et al., 1996), antidepressora (Rodrigues, 1999 apud Aguiar, 2004). No Brasil, é popularmente conhecida como hortelã da folha grossa, hortelã da folha graúda e o chá de suas folhas é utilizado como analgésico, expectorante, antiinflamatório e no combate a infecções.

O óleo essencial de *P. amboinicus* apresenta um alto índice de compostos aromáticos e oxigenados, sendo seu componente majoritário o carvacrol, que possui uma conhecida atividade antimicrobiana (Castillo; Gonzalez, 1999), justificando assim o uso medicinal desta planta no combate a infecções em muitos países. No entanto, muitos fatores como composição do solo, água, temperatura, estresse, umidade podem influenciar no metabolismo e na produção destes compostos fenólicos. Estas variações influenciam diretamente na qualidade da planta de uso medicinal (Santos et al., 2006). Com base nisso, o objetivo desta pesquisa foi realizar a triagem fitoquímica do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. amboinicus* cultivadas na Cidade de João Pessoa - Paraíba, Brasil e avaliar o seu potencial antimicrobiano em cepas bacterianas e fúngicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

As folhas de *P. amboinicus* foram coletadas em Setembro de 2005 no horto do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba – UFPB. Foi elaborada uma exsicata sendo posteriormente depositada no Herbário IPA – Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, com o código JPA 65501. A identificação do material foi feita pela Dra. Rita de Cássia A. Pereira.

Preparação do extrato hidroalcoólico das folhas de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng

Para a obtenção do extrato hidroalcoólico (EH), 2.74 kg de fragmentos das folhas de *P. amboinicus* foram submetidos a um processo de maceração, com etanol a 70% (v/v), em temperatura

ambiente por um período de 72 horas. Em seguida, o material foi filtrado e concentrado a vácuo, em um rotaevaporador, fornecendo desta maneira um resíduo com rendimento de 32.5g.

Perfil fitoquímico

Alíquotas do EH das folhas de *P. amboinicus* dissolvidas em metanol foram analisadas por cromatografia em camada delgada (placas de gel de sílica – MERCK- Alemanha, 105551), empregando-se diversas fases móveis, reveladores adequados à caracterização dos diversos grupos e padrões cromatográficos (Quadro 1). Foi investigada a presença de alcalóides (Wagner, 1996), flavonóides (Neu, 1956; Markham, 1982), protoantocianidinas condensadas e leucoantocianidina (Wagner, 1996), monoterpénóides, sesquiterpénóides e diterpénóides (Wagner, 1996), triterpénóides e esteróides (Sharma; Dawra, 1991), iridóides (Harbone, 1998) e saponinas (Wagner, 1996).

Microrganismos

Os microrganismos utilizados neste estudo foram *Staphylococcus aureus* MRSA (ATCC– 6538), *Staphylococcus aureus* (ATCC– 25923), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Salmonella typhi* (ATCC– 14028), *Salmonella choleraesuis* (ATCC – 10708), *Candida albicans* (ATCC -90.018), *Candida tropicalis* (FCF – 163), *Candida guilliermondii* (LM 06), *Candida krusei* (LM 09), *Candida parapsilosis* (LM 10), *Candida stellatóidea* (LM – 46).

Determinação da atividade antimicrobiana e Concentração Inibitória Mínima

A atividade antimicrobiana e a concentração inibitória mínima (CIM) das amostras foi determinada pelo método de difusão em meio sólido para o EH das folhas de *P. amboinicus* sobre as linhagens bacterianas e fúngicas. Foram realizadas perfurações no meio de cultura (Agar Müller Hinton – DIFCO) de aproximadamente 6 mm de diâmetro. Nos orifícios foi colocado um volume de

50µl da solução do extrato diluído (Cleeland; Squires, 1991). Como controle negativo foi utilizado álcool a 70%. Foi considerada como CIM a menor concentração do extrato que inibiu o crescimento bacteriano e fúngico observado pela presença do halo de inibição (National, 1988).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados da triagem fitoquímica do EH das folhas de *P. amboinicus*, demonstrados na tabela 1, verificou-se a presença de flavonóides (ácido caféico, quercetina e luteolina), monoterpénóides (carvacrol e timol), sesquiterpenóides, diterpenóides triterpenóides, esteróides e derivados cinâmicos (ácido criptoclorogênico e ácido neoclorogênico). Apesar da grande importância econômica e medicinal, as espécies do gênero *Plectranthus* são pouco estudadas. Abdel-Mogibe et al., (2002) descreve os diterpenóides como sendo os metabólitos secundários mais encontrados no gênero *Plectranthus*, e a ocorrência de ácido caféico e ácido clorogênico como característica da família Lamiaceae. As espécies pertencentes à subfamília Nepetoideae são ricas em óleos essenciais, onde *P. amboinicus* está inclusa.

O extrato hidroalcoólico das folhas de *P. amboinicus* não apresentou, sob as condições testadas, a presença de alcalóides, iridóides, saponinas, proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas.

De acordo com os resultados demonstrados na tabela 2, o extrato hidroalcoólico das folhas de *P. amboinicus* mostrou uma potente ação contra bactérias gram-positivas, demonstradas aqui pelas linhagens de *S. aureus* (ATCC 6538) MRSA e *S. aureus* (ATCC 25923), cujos diâmetros dos halos de inibição variaram entre 18 e 16 mm, respectivamente. Estes resultados corroboram com Nogueira, (2004), onde o extrato bruto das folhas de *P. amboinicus* apresentou uma ação antibacteriana sobre cepas de *S. aureus*, isoladas de pacientes portadores de otite externa. Outros estudos demonstraram que o óleo essencial de *P. amboinicus* associado a outros componentes como flavonas e ácidos aromáticos apresentaram ação antibacteriana contra *Pneumococcus* e *Staphylococcus* e, quando testadas em

associações com antibióticos de largo uso medicinal, demonstraram um sinergismo entre o composto vegetal e o sintético (Siegrist, 1986; Oliverira, 2006).

Tal ação antibacteriana deve-se à presença de vários fitoconstituintes com conhecida ação antimicrobiana. Diniz (1997) afirmou que o timol e carvacrol, presente no extrato de *P. amboinicus*, confere-lhes propriedades antimicrobianas. Alguns trabalhos demonstraram que o carvacrol age alterando constituição e aumentando fluidez da membrana celular, sendo este efeito dose dependente (Thompson, 1996; Ultee, 1998). Outros fitoconstituintes encontrados no extrato hidroalcoólico de *P. amboinicus* também possuem uma conhecida ação antimicrobiana. Especula-se que os derivados cinâmicos, terpenos e óleos essenciais ajam causando ruptura da membrana celular por ação de compostos lipofílicos e que os flavonóides se complexam com a parede celular e também causam ruptura da membrana celular (Cowan, 1999).

Curiosamente, os demais microrganismos gram-positivos apresentaram uma discreta inibição no crescimento frente ao extrato de *P. amboinicus*, contrariando outros trabalhos em que o extrato aquoso, fluido e o óleo essencial apresentaram ação contra bactérias gram-positivas (Castillo; Gonzalez, 1999).

Em bactérias gram-negativas não houve inibição do crescimento, demonstrada aqui pelas linhagens de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Salmonella thyphi* ATCC 14028. Oliveira (2006) e Nogueira (2004) também não relataram ação antibacteriana em cepas gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosas*) com o extrato bruto e o óleo essencial de *P. amboinicus* coletados no Nordeste do Brasil. No entanto, o extrato aquoso e fluido das folhas de *P. amboinicus* coletadas em Cuba apresentou um amplo espectro de atividade antimicrobiana tanto em bactérias gram-positivas como em gram-negativas (Castillo; Gonzalez, 1999). O mesmo foi encontrado no banco de dados Napralet (2003), onde *P. amboinicus* inibiu o crescimento de *P. aeruginosas*, *E. coli*.

O extrato hidroalcoólico de *P. amboinicus* também não mostrou ação contra as linhagens de fungos leveduriformes, contrariando os resultados de em estudo com o óleo essencial (Lagouri, 1993 apud Ultee, 1998).

As aparentes discrepâncias devem-se ao fato da ação mais eficaz dos compostos isolados encontrados *P. amboinicus* e também pode ser explicados por vários fatores como áreas, sazonalidades e períodos de coleta, promovendo assim diferenças na concentração destes metabólitos e, subsequentemente, diferenças nas ações microbiológicas do extrato referido.

CONCLUSÕES

Os ensaios fitoquímicos realizados do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. amboinicus* evidenciaram a presença de flavonóides, monoterpênóides, diterpenóides, triterpenóides, sesquiterpenóides, esteróides e derivados cinâmicos.

Os resultados da atividade antimicrobiana indicam que o extrato hidroalcoólico das folhas de *P. amboinicus* apresenta ação antibacteriana contra cepas gram-positivas, especialmente *Staphylococcus aureus*. Tal ação ocorre devido à presença de vários metabólitos secundários de conhecida atividade antimicrobiana, como o carvacrol e timol. Contrariando outros relatos, o extrato não apresentou ação frente aos microrganismos gram-negativos e fungos leveduriformes. Essas variações podem ser justificadas devido aos diferentes áreas e sazonalidades de cultivo desta espécie, que podem variar as concentrações de alguns metabólitos.

Futuros estudos detalhados devem ser realizados acerca das diferenças quantitativas dos metabólitos secundários de *P. amboinicus* em locais, períodos e épocas diferentes de colheita com o objetivo de padronizar o referido extrato.

AGRADECIMENTOS

Ao Agrônomo Fernando Antonio C. Viana, coordenador do Horto Medicinal do LTF/UFPE. Ao técnico do laboratório Raimundo Nonato da Silva LTF/UFPE. A agência financiadora desta pesquisa CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Mogib M, Albar HA, Batterjee SM 2002. Chemistry of the Genus *Plectranthus*. *Molecules* 7: 271-30;

Aguiar FB 2004. *Ensaio clínico de fase II para avaliação de um fitoterápico composto (Shinus terebinthifolius Raddi; Plectranthus amboinicus Lour., e Eucalyptus globulus Labill)*. João Pessoa, 438p. Tese de Doutorado – Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba;

Chechinel-Filho V, Yunes RA 1998. Strategies for obtaining pharmacologically active compounds from medicinal plants concepts about structural modification from improve the activity. *Quim Nova* 21: 99-105;

Castillo RAM, Gonzalez VP 1999. *Plecthranthus amboinicus* (lour.) spreng. *Rev Cubana Plant Med* 3: 110-5;

Cowan MM 1999. Plant Products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 564–582;

Cleeland R, Squires E 1991. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. In: Lorian VMD, ed. Antibiotics in Laboratory Medicine. Baltimore: Williams & Wilkins 739 789;

Cunha RM 2004. *Efeitos do óleo Essencial de Ocotea ducka Valtimo (Lauraceae) sobre parâmetros cardiovasculares de ratos*. João Pessoa, 106p. Tese de Doutorado – Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba;

Diniz MFFM et al., 1997. Memento fitoterápico: as plantas como alternativa terapêutica; conhecimentos populares e científicos. João Pessoa 205p. Ed Universitária, Universidade Federal da Paraíba;

Harbone JB 1998. Phytochemical Methods. 3ªed., London: Chapman & Hall;

Markham KR 1982. Thecniques of flavonoid identification. London: Academic Press;

National Committee for Clinical laboratory Standart NCCLS, 1988. Methods for diluition antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobibally. 2ª ed. Tentative Standart. Document M7 – T2 8: 8;

Napralert 2003. Natural Products Alert. Program for Collaborative Research in the Pharmacological Sciences (PCRPS), A world Health Organization Collaborating Centre for Traditional Medicines. College of Pharmacy, University of Illinois, Chicago, EUA;

Neu R 1956. A New reagent for differentiating and determining flavones of paper chromatograms. *Naturwissenschaften* 43: 82;

Nogueira JCR 2004. *Atividade antimicrobiana in vitro de produtos vegetais sobre microrganismos isolados de pacientes portadores de otite externa aguda*. João Pessoa, 180p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Produtos Sintéticos e Bioativos. Universidade Federal da Paraíba;

Oliveira RAG 2006. *Plantas medicinais usadas tradicionalmente na Dermatologia: Avaliação da atividade biológica dos seus extratos, óleos essenciais e suas associações*. João Pessoa, 180 p. Tese de doutorado do Programa de Pós Graduação em produtos sintéticos e bioativos. Universidade Federal da Paraíba;

Parra V, Ruiz RA 1999. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Orégano Francês). Estúdio toxicogenético de um extracto fluido y del aceite essencial. *Rev Cubana de Plant Med* 2: 68-73;

Siegrist BE 1986. Efficacy of supervised rinsing with chlorhexidine digluconate in comparison to phenolic and plant alkaloid compounds. *J Periodont Res* 21: 66-73;

Silva KL, Chechinel-Filho V 2002. Plants of the genus *Bauhinia*: chemical composition and pharmacological potential. *Quím Nova* 25: 449-454;

Sálman JGD, Jimenez TEG, Castilho RM 1996. Efecto antioxidante de los extractos fluido e de flavanóides del *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (Orégano Francés). *Rev Cubana de Plant Med* 2: 27-30;

Sharma OP, Dawra RK 1991. Thin-layer chromatographic separations of lantadens, the pentacyclic triterpenoids from (*Lantana camara*) plant. *J Chrom* 587: 351-354;

Santos CS, Costa FW, Santos RL, Ferri HP, Derreira DH, Seraphin CJ 2006. Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 16: 552-556;

Thompson DP 1996. Inhibition of growth of mycotoxigenic *Fusarium* species by butylated hydroxyanisole and or carvacrol. *Journal of Food Protection* 59: 412-415;

Utree A, Gorris LGM, Smid EJ 1998. Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology* 85:211-218;

Wagner H, BLADT S 1996. Plant drug analysis – A thin layer chromatography atlas. 2^aed. Berlin: Springer Verlag, p. 384.

Quadro 1- Sistemas cromatográficos utilizados para a caracterização fitoquímica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Plectranthus amboinicus* Lour

Grupo de Metabólitos	Fase Móvel	Revelador	Referência
Alcalóides	EtOAc-HCOOH- AcOH-H ₂ O (100:11:11:26 v/v)	Dragendorff	Wagner, 1996
Derivados Cinâmicos	EtOAc-HCOOH- AcOH-H ₂ O (100:11:11:26 v/v)	2 aminoetildifenil borinato	Markham, 1982 e Neu, 1956
Flavonóides	EtOAc-HCOOH- AcOH-H ₂ O (100:11:11:26 v/v)	2 aminoetildifenil borinato	Markham, 1982 e Neu, 1956
Protoantocianidinas Condensadas e Leucoantocianidinas	EtOAc-HCOOH- AcOH-H ₂ O (100:11:11:26 v/v)	Vanilina clorídrica	Wagner, 1996
Monoterpenóides, Sesquiterpenóides e Diterpenóides	Benzeno-AcOEt (97:3 v/v)	Vanilina sulfúrica	Wagner, 1996
Triterpenóides e Esteróides	EtOAc- HCOOH- AcOH-H ₂ O (100:0,5:0,5:0,5 v/v)	Liebermann Burchard	Sharma, 1991
Iridóides	EtOAc-HCOOH- AcOH-H ₂ O (100:11:11:26 v/v)	Vanilina sulfúrica	Harbone, 1998
Saponinas	EtOAc-HCOOH- AcOH-H ₂ O (100:11:11:26 v/v)	Anisalaldeído	Wagner, 1996

Tabela 1- Metabólitos secundários encontrados no extrato hidroalcoólico das folhas de *P. amboinicus*

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE <i>Plectranthus amboinicus</i> Lour
Alcalóides	Negativo
Flavonóides	
• Quercetina	Positivo
• Ácido caféico	Positivo
• Luteolina	Positivo
Derivado Cinâmico	
• Ácido Criptoclorogênico	Positivo
• Ácido Neoclorogênico	Positivo
Saponinas	Negativo
Monoterpenóides, Sesquiterpenóides e Diterpenóides	
• Carvacrol	Positivo
Terpenóides e Esteróides	
• β - Sitosterol	Positivo
• β - Amirina	Positivo
• Ácido Ursólico	Negativo
Iridóides	Negativo
Proantocianidinas condensadas e Leucoantocianidinas	Negativo

Tabela 2: Média dos diâmetros de halos de inibição (em mm) da atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. amboinicus*, em cepas gram-positivas, gram-negativas e fungos leveduriformes

<i>Produto/ Concentração</i>	EH de <i>P. amboinicus</i> 1200 mg.ml ⁻¹	EH de <i>P. amboinicus</i> 600 mg.ml ⁻¹	EH de <i>P. amboinicus</i> 300 mg.ml ⁻¹	EH de <i>P. amboinicus</i> 150 mg.ml ⁻¹	EH de <i>P. amboinicus</i> 75mg.ml ⁻¹	EH de <i>P. amboinicus</i> 37.5mg.ml ⁻¹	EH de <i>P. amboinicus</i> 18.75 mg.ml ⁻¹	Etano 70%
<i>Microrganismos</i>								
<i>S. aureus</i> (ATCC- 6538)	16	12	10	10	0	0	0	+
<i>S. aureus</i> (ATCC – 25923)	18	18	15	14	12	11	0	+
<i>M. luteus</i> (ATCC- 9341)	18	18	14	12	0	0	0	+
<i>S. thyphi</i> (ATCC- 14028)	0	0	0	0	0	0	0	+
<i>S. choleraesuis</i> (ATCC- 10708)	14	11	11	0	0	0	0	+
<i>C. albicans</i> (ATCC- 90.018)	0	0	0	0	0	0	0	+
<i>C. stellatóidea</i> (LM – 46)	0	0	0	0	0	0	0	+
<i>C. paraliopsis</i> LM 10	0	0	0	0	0	0	0	+
<i>C. krusei</i> LM 09	0	0	0	0	0	0	0	+
<i>C. guilliermondii</i> LM 06	0	0	0	0	0	0	0	+
<i>C. tropicalis</i> FCF 163	0	0	0	0	0	0	0	+

+ Crescimento



5. ARTIGO II

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E CURVA DE MORTALIDADE DO
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Plectranthus amboinicus*
(Lour.) Spreng (LAMIACEAE) EM AMOSTRAS HUMANAS DE *Staphylococcus
aureus* RESISTENTES A METICILINA (MRSA)**

Ana Pavla A. D. Gurgel^{1*}, Jackeline G. da Silva¹, Rinalda A. G. Oliveira², Maria do Socorro V. Pereira³, Ivone Antônia de Souza⁴

1 Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-521, Recife, PE, Brasil

2 Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Federal da Paraíba, Av. Castelo Branco, S/N, Cidade Universitária 58051-900, João Pessoa, PB, Brasil,

3 Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, Av. Castelo Branco, S/N, Cidade Universitária 58051-900, João Pessoa, PB, Brasil,

4 Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Arthur de Sá, S/N, Cidade Universitária, 50740-521, Recife, PE, Brasil,

RESUMO

Plectranthus amboinicus (Lour) Spreng., é nativa da Ásia Oriental e encontra-se distribuída por toda a América, sendo conhecida popularmente como hortelã da folha graúda, hortelã da folha grossa e orégano francês. É amplamente utilizada na medicina popular como antibacteriano, antimicótico, antiinflamatório. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana, a concentração inibitória mínima e a cinética bacteriana do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. amboinicus* em amostra de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA). A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em meio sólido. Para a avaliação da concentração inibitória mínima foi adotado o método de diluição em meio sólido. Os resultados indicam uma potente ação do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. amboinicus* sobre linhagens de *S. aureus* fenotipicamente resistentes a Meticilina. A concentração inibitória mínima oscilou entre 18.7 e 9.3 mg.mL⁻¹ do referido extrato e a curva da cinética bacteriana sugere uma ação tanto bactericida como bacteriostática, variando conforme concentração do extrato. Estes resultados são bastante promissores tendo em vista que este patógeno é o maior causador de infecções hospitalares.

Palavras-chave: *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng; Atividade Antimicrobiana; *Staphylococcus aureus* MRSA.

ABSTRACT

Plectranthus amboinicus (Lour) Spreng., is native of Asia Eastern and distributed by all America, being known popularly as “hortelã da folha graúda”, “hortelã da folha grossa” and oregano. Widely it is used in the folk medicine as antibacterial, antimycotic, anti-inflammatory. The objective of this work was to evaluate antimicrobial activity, kinetic bacterial and minimum inhibitory concentration of the hydroalcoholic extracts of leaves of *P. amboinicus* in *Staphylococcus aureus* Methicillin resistant (MRSA). The antimicrobial activity was determined by the method of diffusion in agar. For the evaluation of the minimum inhibitory concentration was used method of dilution in agar. The results indicate a powerful action of hydroalcoholic extracts of leaves of *P. amboinicus* on *Staphylococcus aureus* Methicillin resistant (MRSA). Minimum inhibitory concentration oscillated between 18.7 and 9.3 mg.mL⁻¹ de the related extract and the kill-curve curve suggests an action in such bactericidal as bacteriostatic, varying as concentration of the extract. These results are promising since this pathogen is the causing greater of hospital infections.

Key-words: *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng; Antimicrobial Activity; *Staphylococcus aureus* MRSA.

1. INTRODUÇÃO

Plectranthus amboinicus (Lour.), é uma espécie nativa da Ásia e distribuída por toda a América. É popularmente conhecida como hortelã da folha grossa, orégano francês e é bastante utilizada para combater cefaléias, inflamações e infecções. Possui uma composição química rica em óleos essenciais, com a presença de timol, carvacrol, terpenos, flavonóides e taninos, todos estes compostos com conhecida ação antimicrobiana. Investigações farmacológicas prévias mostraram que *P. amboinicus* possui propriedades citotóxicas, genotóxicas [1], antibacteriana, anti-viral [2], antiepiléptica, antioxidante e antidepressora [3].

Staphylococcus aureus é o patógeno gram-positivo, sendo considerado como o causador de infecções em humanos. *S. aureus* resistente a Meticilina (MRSA) surgiu em meados de 1960 e hoje represente cerca de 54.5% do percentual de infecções hospitalares em todo o mundo. Estas linhagens de *S. aureus* MRSA são resistente não somente aos β-lactâmicos, mas também com clorafenicol,

clindamicina, tetraciclina, sendo essa resistência cromossômica mediada pela PBP-2 (Proteína Fixadora de Penicilina) [4]. Avaliação de medidas, controle e prevenção para infecções hospitalares causadas por *S. aureus* MRSA são numerosas em vários centros médicos, evidenciado pela possibilidade de surtos epidêmicos de estafilococos.

O uso de extratos de plantas e seus constituintes fitoquímicos, com conhecida propriedades antimicrobianas, são de grande importância na terapêutica de infecções. A ação antimicrobiana deve-se a síntese de componentes do metabolismo secundário dos vegetais, tais como óleos essenciais, compostos fenólicos e taninos. [5]. Com base nisso, esta pesquisa investigou a ação antimicrobiana, a concentração inibitória mínima e a cinética bacteriana do Extrato hidroalcoólico das folhas de *P. amboinicus* em cepas *S. aureus* MRSA

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

As folhas de *P. amboinicus* foram coletadas em Setembro de 2005 no horto do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba – UFPB. Foi elaborada uma exsicata sendo posteriormente depositada no Herbário IPA – Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, com o código JPA 65501. A identificação do material foi feita pela Dra. Rita de Cássia A. Pereira

2.2 Preparação dos Extratos e Microrganismos

Para a obtenção do extrato hidroalcoólico (EH), fragmentos das folhas de *P. amboinicus* foram submetidos a um processo de maceração, com etanol a 70% (v/v), em temperatura ambiente por um período de 72 horas. Em seguida, o material foi filtrado e concentrado a vácuo, em um rotavapor, fornecendo desta maneira um resíduo de 32,5g.

Todos os microrganismos utilizados são oriundos da coleção do Laboratório de

Genética de Microrganismos, Universidade Federal da Paraíba, sendo nove das onze cepas isoladas de pacientes do Hospital Universitário Lauro Wanderley.

2.3 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das amostras foi determinada pelo método de difusão em meio sólido para o EH das folhas de *P. amboinicus* sobre as linhagens de *S. aureus* MRSA. Foram realizadas perfurações no meio de cultura (Agar Müeller Hinton – DIFCO) de aproximadamente 6 mm de diâmetro. Nos orifícios foi colocado um volume de 50µl da solução do extrato diluído [6]. Como controle negativo foi utilizado álcool a 70% e os experimentos foram feitos em duplicata.

2.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi feita pelo método de diluição em meio sólido [7], usando concentrações crescentes e dobradas, que variaram de 1.200 a 2.3 mg.mL⁻¹ do EH das folhas de *P. amboinicus*. Uma série de placas foi preparada, nelas vertendo-se 18 mL do meio de cultura (Agar Müeller Hinton – DIFCO) mantido a 50° C, acrescido de 2 mL do extrato em várias diluições, para serem obtidas as concentrações finais desejadas. As amostras de *S. aureus* foram cultivadas em caldo nutritivo (Brain Heart Infusion – DIFCO), incubadas a 37° C por 18 a 20 horas, diluídas a 10⁻² em solução salina e inoculadas com uma multialça (11 amostras por placa). As placas foram incubadas a 37°C por 18–24 horas e foi considerada como CIM a menor concentração do extrato que inibiu completamente o crescimento bacteriano. Como controle da atividade do EH de *P. amboinicus* foi empregada a linhagem ATCC 29213 [8]. Como controle negativo foi utilizado álcool a 70% e Norfloxacin® 100 µg como controle positivo. Os experimentos foram realizados em duplicata.

2.5 Cinética Bacteriana

As amostras de *S. aureus* foram inoculadas em caldo nutritivo (Brain Heart Infusion – DIFCO), incubadas a 37°C por 18 – 20 horas e subcultivadas em Caldo Mueller Hinton por 1 hora, obtendo-se

um inoculo de 10^6 UFC/mL. A 9 mL da cultura bacteriana foi adicionado 1mL do extrato de *P. amboinicus* e aos tubos controles foram adicionados 1 mL de água destilada e esterilizada. Os tubos foram mantidos na estufa a 37^0 C por 24 horas, e alíquotas foram retiradas após 2, 4, 6, 8 e 10 horas de incubação e semeadas em Agar Müeller Hinton – DIFCO. A leitura das placas foi efetuada após incubação por 48 horas a 37^0 C, pelo método padrão de contagem em placas [9].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade Antimicrobiana

De acordo com os resultados demonstrados na figura 1, o EH das folhas de *P. amboinicus* mostrou uma potente ação contra todas as cepas de *S. aureus* (MRSA) testadas, com halos de inibição variaram entre 23 a 10 mm de diâmetro, nas concentrações de 150, 75, 37.5, 18.7, e 9.3 mg.mL⁻¹. Estes resultados corroboram com o estudo do extrato bruto das folhas de *P. amboinicus* apresentou ação antimicrobiana sobre cepas de *S. aureus*, isoladas de pacientes portadores de otite externa [10]. Tal ação antibacteriana deve-se à presença de carvacrol, terpenos, entre outros fitoconstituintes, presente no extrato e que possui uma conhecida atividade antimicrobiana. Alguns trabalhos afirmam que o timol e carvacrol, presentes no óleo essencial de *P. amboinicus*, confere-lhes propriedades antimicrobianas [11]. O estudo com o óleo essencial de *P. amboinicus* associado a outros componentes como flavonas, ácidos aromáticos e taninos, demonstrou uma ação antibacteriana contra *Pneumococcus* e *Staphylococcus* e outros trabalhos relatam que além da atividade antimicrobiana, o óleo essencial associado a antimicrobianos de largo uso medicinal apresentaram um efeito sinérgico [12, 13].

3.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) das amostras de *S. aureus* (MRSA), variou entre 18,7 mg.mL⁻¹ a 9,3 mg.mL⁻¹, que correspondem, respectivamente, a 0,32 e 0,16% do EH das folhas de *P. amboinicus*. Observou-se que quatro amostras (40%) foram sensíveis até uma concentração de 18,7

mg.mL⁻¹, cinco (50%) para 9,3 mg.mL⁻¹, apenas uma amostra única amostra para 4,3 mg.mL⁻¹. A amostra 19 Lab mostrou-se sensível em todas as concentrações testadas. Estes resultados indicam a eficácia do EH de *P. amboinicus*, uma vez que todas as amostras testadas são fenotipicamente resistentes à Penicilina, Eritromicina, Estreptomicina, Clorafenicol, Gentamicina, e alguns íons metálicos tais como Cádmio e Mercúrio.

3.3 Cinética bacteriana

Quatro amostras de *S. aureus* (MRSA), escolhidas aleatoriamente, foram submetidas à curva de mortalidade de cepas bacterianas em diferentes concentrações, conforme as figuras 2, 3, 4, e 5. Na concentração de 1.200 mg.mL⁻¹ observou-se que um efeito bactericida da amostra 171 C MRSA nas primeiras hora de exposição. Tal efeito é promissor visto que a velocidade de morte celular na primeira hora de exposição é muito semelhante às da fluorquinolonas, perfloxacina, ofloxacina e norfloxacina, antibióticos de largo espectro muito utilizados na medicina veterinária e humana.

Também foram testadas as concentrações 18.7 mg.mL⁻¹, que correspondem ao valor duplicado da CIM, e 37.5 mg.mL⁻¹, o valor quadruplicado da CIM. Os resultados mostram que, nas duas concentrações (2X CIM, 4X CIM), o extrato de *P. amboinicus* mostrou ação bacteriostática, ou seja, após 24 horas as amostras tratadas de *S. aureus* permanecem, em média, com UFC/m de 10⁵, enquanto que as amostras controle aumentam para UFC/m 10⁷. Esta ação bacteriostática corrobora com outros resultados obtidos onde linhagens de *S. aureus* foram sensíveis ao extrato hidroalcoólico de *P. amboinicus* [14].

4. CONCLUSÃO

Os resultados indicam uma potente atividade antibacteriana do EH das folhas de *P. amboinicus* frente às linhagens de *S. aureus* MRSA. A curva de mortalidade mostrou uma ação bactericida e bacteriostática do extrato nas primeiras horas de exposição. Tal resultado é de grande importância devido ao grande espectro de resistência que estas linhagens apresentam. Novas investigações devem ser feitas na busca dos princípios ativos presentes no extrato com potencial antibacteriano. Os resultados deste trabalho comprovam o uso popular de *P. amboinicus* em infecções e abre novos caminhos na obtenção de um medicamento de amplo espectro aumentando a eficácia terapêutica no combate a infecções hospitalares causadas por *S. aureus* MRSA.

AGRADECIMENTOS

Ao Agrônomo Fernando Antonio C. Viana, coordenador do Horto Medicinal do LTF/UFPE. Ao técnico do laboratório Raimundo Nonato da Silva LTF/UFPE. A agência financiadora desta pesquisa CNPq.

REFERÊNCIAS

- [1] Parra V, Ruiz RA 1999. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Orégano Francês). Estúdio toxicogénico de um extracto fluido y del aceite essencial. Rev Cubana de Plant Med 2: 68-73;
- [2] Napralert 2003. Natural Products Alert. Program for Collaborative Research in the Pharmacological Sciences (PCRPS), A world Health Organization Collaborating Centre for Traditional Medicines. College of Pharmacy, University of Illinois, Chicago, EUA;

- [3] Sálman JGD, Jimenez TEG, Castilho RM 1996. Efecto antioxidante de los extractos fluido e de flavanóides del *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (Orégano Francés). Rev Cubana de Plant Med 2: 27-30;
- [4] Takashi K, Yuko A, Yoichi A, Shimeru K, Shigeru K, Nobuhiro I, Mikiro N, Hitoshi S, Shun H. In vitro activity of lauric acid or myristilamine in combination with six antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Int J Antimicrob Agents 2005;27:51-57;
- [5] Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas C, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals and antibiotic-resistant bacteria. Brazilian Journal of Microbiology 2000;31:247-256;
- [6] Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. In: Lorian VMD, ed. Antibiotics in Laboratory Medicine. Baltimore: Williams & Wilkins 1991;739 – 789;
- [7] EUCAST Definitive Document. Determination of minimum inhibitory concentrations (MIC's) of antimicrobial agents by ágas dilution. EUCAST Definitive Document, E. Def 3.1 2000;6:509-515;
- [8] National Committee for Clinical laboratory Standart NCCLS. Methods for diluition antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobibally. 2^a ed. Tentative Standart. Document M7 – T2 1988;8: 8;
- [9] Peyret M, Carret G, Carre C, Fardel G, Flandrois JP. Etude mathematique de la curve de mortalite d' *Escherichia coli* expose aux polymixines. Pathologie Biologie 1990;38:441-445;

- [10] Nogueira JCR. Atividade antimicrobiana in vitro de produtos vegetais sobre microrganismos isolados de pacientes portadores de otite externa aguda. João Pessoa, 180p. 2004. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Produtos Sintéticos e Bioativos. Universidade Federal da Paraíba;
- [11] Diniz MFFM. Memento fitoterápico: as plantas como alternativa terapêutica; conhecimentos populares e científicos. João Pessoa 205p. 1997. Ed Universitária, Universidade Federal da Paraíba;
- [12] Siegrist BE. Efficacy of supervised rinsing with chlorhexidine digluconate in comparison to phenolic and plant alkaloid compounds. J Periodont Res 1986;21: 66-73;
- [13] Oliveira RAG. Plantas medicinais usadas tradicionalmente na Dermatologia: Avaliação da atividade biológica dos seus extratos, óleos essenciais e suas associações. João Pessoa, 180 p. 2006. Tese de doutorado do Programa de Pós Graduação em produtos sintéticos e bioativos. Universidade Federal da Paraíba;
- [14] Castillo RAM, Gonzalez VP. *Plecthranthus amboinicus* (lour.) spreng. Rev Cubana Plant Med 1999;3: 110-5;

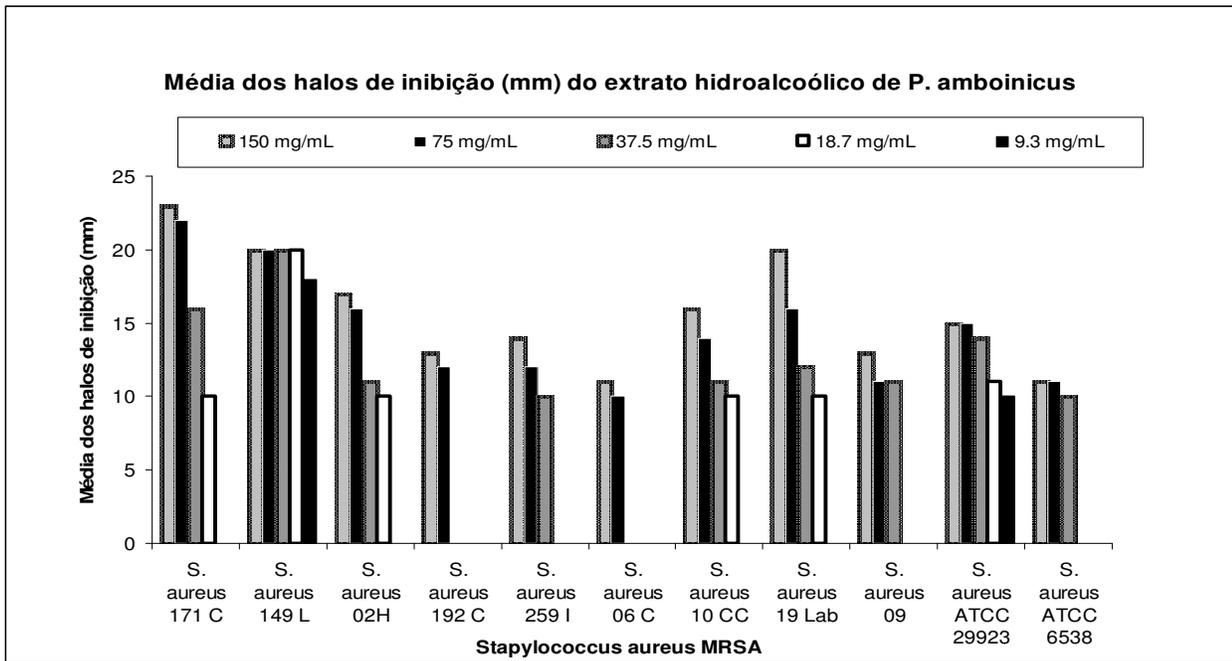


Gráfico 1- Média dos halos de inibição do EH das folhas de *P. amboinicus* em linhagens de *S. aureus* MRSA.

Tabela 3 – Concentração inibitória mínima do extrato bruto das folhas de *P. amboinicus* frente aos microrganismos *S. aureus* MRSA.

Linhagens Bacterianas	Concentração do EH das folhas de <i>Plectranthus amboinicus</i> em mg.kg⁻¹											
	Etanol 70%	Norfloxacina 10µg	2.3	4.6	9.3	18.7	37.5	75	150	300	600	1.200
149L	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
171CC	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10CC	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
02H	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
06C	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
259I	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
19L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
192C	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ATCC 25923	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ATCC 6538	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

+ Crescimento; - inibição.

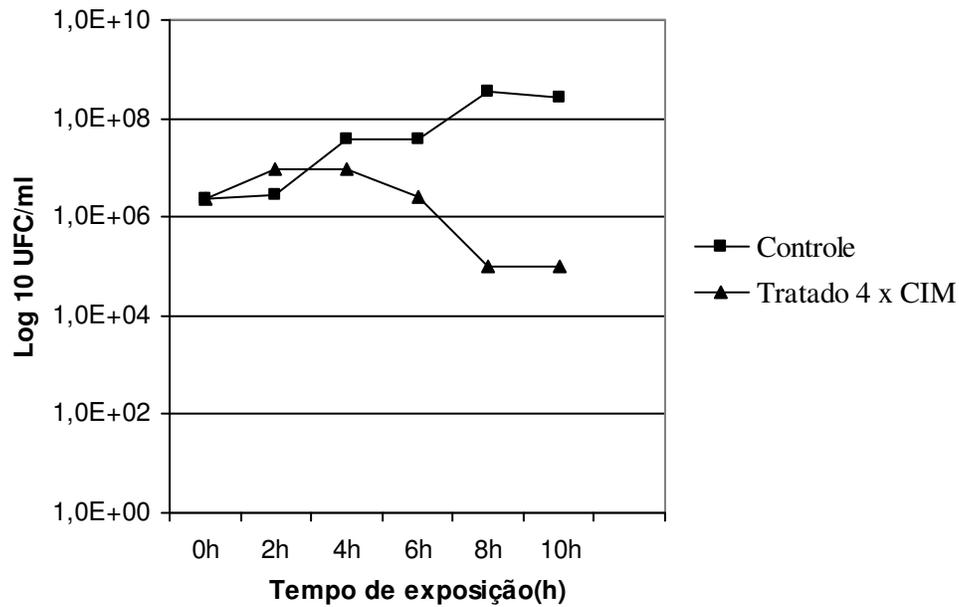


Gráfico 2 - Curva de ação bactericida do EH de *P. amboinicus* (37.5 mg.mL^{-1}) sobre a amostra de *S. aureus* ATCC 6538 MRSA

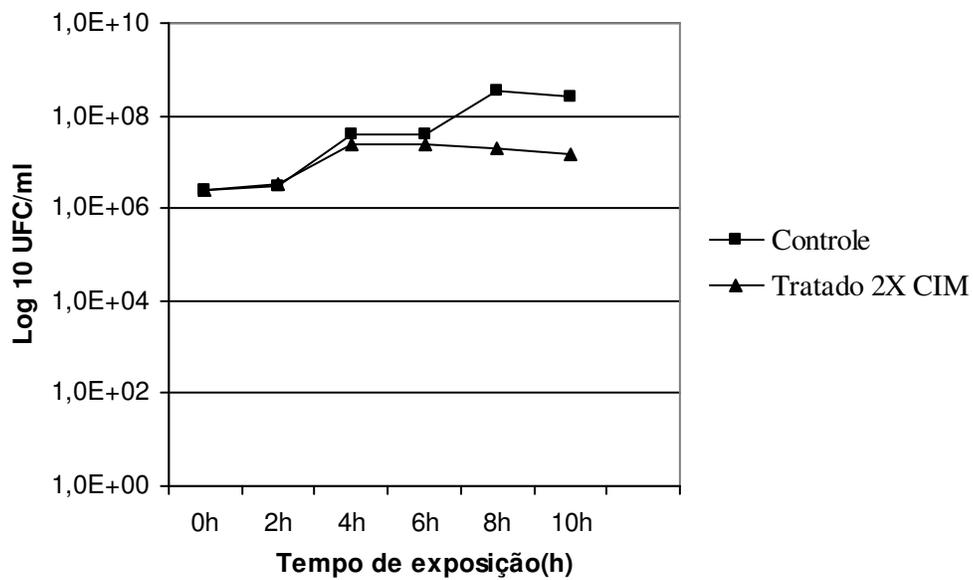


Gráfico 3 - Curva de ação bacteriostática (18.7 mg.mL^{-1}) do extrato de *P. amboinicus* sobre a amostra de *S. aureus* ATCC 6538 MRSA

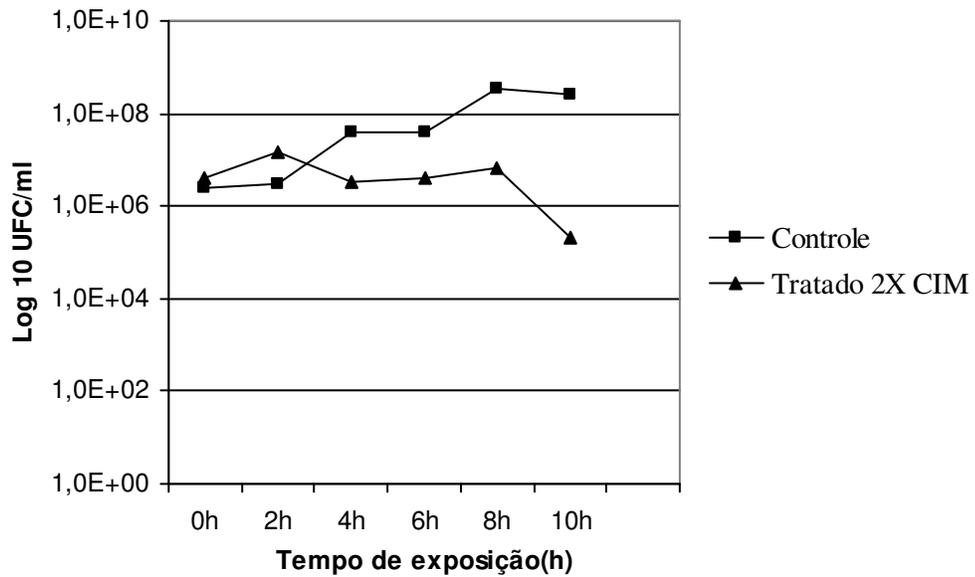


Gráfico 4 - Curva de ação bacteriostática (18.7 mg.mL^{-1}) do extrato de *P. amboinicus* sobre a amostra de *S. aureus* 10CC MRSA

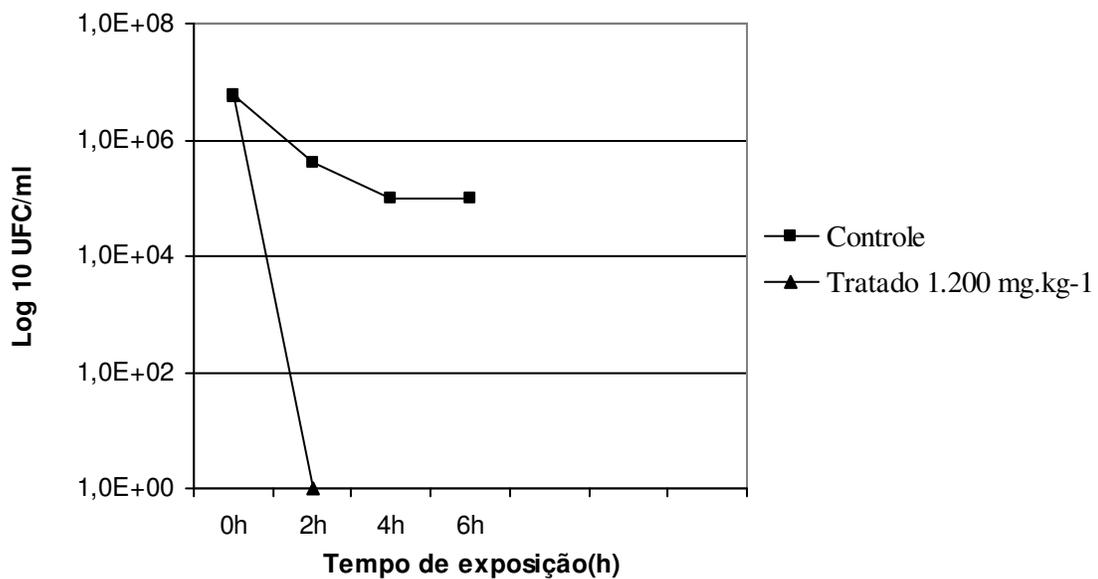


Gráfico 5 - Curva de ação bactericida (1.200 mg.mL^{-1}) do extrato de *P. amboinicus* sobre a amostra de *S. aureus* 171C MRSA



6. *ARTIGO III*

Avaliação da toxicidade aguda e atividade antiinflamatória do extrato hidroalcoólico das folhas de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae)

Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel^{1*}, Aldo César Passilongo da Silva¹, Ana Ruth Sampaio Grangeiro¹, Cynthia Maria Pontes de Lima¹, Rinalda Araújo Guerra de Oliveira², Ivone Antônia de Souza³

1 Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-521, Recife, PE, Brasil,

2 Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Federal da Paraíba, Av. Castelo Branco, S/N, Cidade Universitária 58051-900, João Pessoa, PB, Brasil,

3 Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Arthur de Sá, S/N, Cidade Universitária, 50740-521, Recife, PE, Brasil.

RESUMO

“Avaliação da toxicidade aguda e atividade antiinflamatória do extrato hidroalcoólico das folhas de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae)”

Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng é comumente usada na medicina popular no Brasil como um antiinflamatório, analgésico e antipirético. O presente estudo avaliou o possível efeito antiinflamatório e a toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. amboinicus* em modelos experimentais com animais. Os resultados obtidos mostram que o extrato de *P. amboinicus* apresenta um efeito antiinflamatório significativo nas doses de 150, 250 e 350 mg.mL⁻¹, por via intraperitoneal. Efeitos estimulantes, tais como exoftalmia, agitação, reação de fuga, irritabilidade, tremores, movimento de vibrissas, estereotípias e movimentos circulares foram observados. 30 minutos após as administrações, reações depressivas foram observadas, como: prostração e diminuição da frequência respiratória. Não foram observados óbitos.

Unitermos: *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, Toxicidade Aguda, Atividade Antiinflamatória

ABSTRACT

“Evaluation of the acute toxicity and anti-inflammatory activity of the hydroalcoholic extract of leaves of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae)”

Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng, is commonly used in the Brazilian folk medicine as anti-inflammatory, analgesic and antipyretic. The present study evaluated the possible anti-inflammatory effect and acute toxicity of the hydroalcoholic extract of leaves of *P. amboinicus* in experimental animals. The results obtained showed that extract of *P. amboinicus* presented significant effect anti-inflammatory edemas, 150, 250 and 350 mg.mL⁻¹, by form intraperitoneal. Stimulant effects, such as exophthalmia, agitation, irritability, reactions of escape, tremors, vibrissys’s movement, stereotypy and

circle's movement were observed. 30 minutes after administration, depressive reactions were observed: prostration and decreased heart rate. No deaths of toxicity were observed.

Key-words: *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, Acute Toxicity, Anti-inflammatory Activity.

INTRODUÇÃO

A procura por novos agentes farmacologicamente ativos obtidos de plantas, tem levado a descoberta de muitas drogas clinicamente ativas. Diversas plantas da flora brasileira são utilizadas na medicina popular, mas muitas delas ainda necessitam de estudos que dêem suporte científico ao seu uso na terapêutica (Silva et al., 2005).

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas. A toxicidade de planta medicinal é um problema sério e de saúde pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente (Veiga Jr. et al., 2005).

Plectranthus é um gênero grande pertencente à família Lamiaceae, que contém mais de 300 espécies comumente encontradas em regiões tropicais, na África, Ásia e na Austrália. As espécies mais frequentemente citadas são *Plectranthus amboinicus* e *Plectranthus barbatus* devido as suas propriedades medicinais, sendo responsável por mais de 85% das citações, e 68% deste percentual apenas para o uso medicinal (Lukhoba et al., 2005).

Plectranthus amboinicus ou *Coleus amboinicus* é uma espécie nativa da Ásia e distribuída por toda a América, sendo popularmente conhecida como hortelã da folha grossa, orégano e orégano francês. É utilizada para combater cefaléias, inflamações e infecções.

Investigações farmacológicas prévias mostraram que *P. amboinicus* possui propriedades citotóxicas, genotóxicas (Parra; Ruiz,1999), antibacteriana, anti-viral (Napralert, 2003), antiepiléptica, antioxidante (Sálman et al, 1996) e antidepressora, (Rodríguez, 1999).

P. amboinicus possui em sua composição química óleos essenciais açúcares redutores, triterpenos, esteróides, fenóis e carvacrol (Acosta et al., 1998). Apresentam também terpenos, flavanóides e taninos (Matick apud Aguiar, 2004).

Os Flavonóides tem sido alvo de muitos estudos farmacológicos, especialmente em purificações de compostos de origem vegetal com aplicação na terapêutica da inflamação. Tais fitoconstituintes induzem a oxidação de alguns aminoácidos da fosfolipase A₂ (PLA₂), inibindo, obstruindo e modificando estruturalmente estas enzimas. O α -tocoferol, um bioantioxidante universal, diminui a atividade isolada da enzimática da PLA₂, reduzindo conseqüentemente à ação antiinflamatória (Chandra et al., 2002).

Estudos demonstram que os flavonóides e o extrato aquoso de *P. amboinicus* possuem um poderoso efeito antioxidante na inibição da formação de produtos reativos ao ácido tiubarbitúrico, sendo o extrato de flavonóides superior ao efeito do α -tocoferol (Sálman et al., 1996). Com base nos dados supracitados, o presente artigo avaliou a toxicidade aguda e a atividade antiinflamatória extrato hidroalcoólico das folhas de *P. amboinicus*, já que esta planta é popularmente utilizada para o combate de inflamações do colo uterino.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

As folhas de *P. amboinicus* foram coletadas em Setembro de 2005 no horto do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba – UFPB. Foi elaborada uma excisata sendo posteriormente depositada no Herbário IPA – Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, com o código JPA 65501. A identificação do material foi feita pela Dra. Rita de Cássia A. Pereira.

Preparação dos Extratos

Para a obtenção do extrato hidroalcoólico (EH), as folhas de *P. amboinicus* foram submetidas a um processo de maceração, com etanol a 70% (v/v), em temperatura ambiente por um período de 72 horas. Em seguida, o material foi filtrado e concentrado a vácuo, em um rotavapor, fornecendo desta maneira o resíduo do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. amboinicus*.

Toxicidade aguda e Determinação da DL₅₀

Para avaliar a toxicidade aguda do EH das folhas de *P. amboinicus*, foram utilizados camundongos fêmeas albinos Swiss (*Mus musculus*), com idade entre 60- 90 dias e peso variando entre 25 a 35 g, divididos em grupos de seis animais por gaiola. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, em condições controladas de iluminação (ciclo de 12 horas claro/escuro) e temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, recebendo água *ad libitum*, obedecendo às normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). As doses administradas foram: 500, 750, 1.125, 1.690, 2.535, 3.800 mg.kg⁻¹ por via intraperitoneal (i.p), apenas uma única dose oral (v.o) 4.000 mg.kg⁻¹. Os animais foram observados por um período de 48 horas após as administrações das doses e, os óbitos neste período foram contabilizados para o calculo da DL₅₀, segundo o método preconizado por Karber; Benhrens (1964).

Triagem Farmacológica

Realizaram-se também triagens farmacológicas dos efeitos gerais de cada dose administrada com a finalidade de correlacionar tais efeitos comportamentais a uma ação sobre Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Autônomo (SNA). Após os tratamentos, os animais foram observados em um período de 60 minutos.

Atividade antiinflamatória

O teste da atividade antiinflamatória foi realizado segundo o método de Winter et al., (1962). Foram utilizados ratos Wistar fêmeas (*Rattus navegicus*) com 60 a 90 dias de idade, peso entre 250 ± 50 g, divididos em grupos de cinco animais por gaiola. Os animais foram mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo de 12 horas claro/escuro) com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, recebendo água *ad libidum*.

A o edema foi induzido pela injeção de 0,1 mL de carragenina a 0,1% na região subplantar da pata esquerda posterior dos animais pertencentes aos grupos controle, padrão e tratados. Antes da administração da carragenina e trinta minutos após, foram mensurados os volumes das patas. Em seguida, em cada hora foram quantificados os volumes das patas com edema, perfazendo um total de 6 horas de observação. As concentrações do EH das folhas de *P. amboinicus* administrados foram de 150, 250 e 350 mg.kg^{-1} , nos animais dos grupos tratados com o extrato, 10 mg.kg^{-1} de Indometacina nos animais do grupo padrão e solução salina a 0,9% no grupo controle.

Tratamento Estatístico

Os dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e teste “t” de Student para avaliar as diferenças entre os grupos controles e tratados.

RESULTADOS

Após a administração do EH de *P.amboinicus* nas doses de 500 a 3800 mg.kg^{-1} (i.p) e 4000 mg.kg^{-1} (v.o), não houve registro de óbitos e, desta maneira, não foi possível determinar a DL_{50} com uma possível dose máxima, como recomenda a literatura.

A triagem farmacológica do EH de *P. amboinicus* indica uma forte ação sobre o Sistema Nervoso Central. Nas doses administradas por via oral e intraperitoneal, durante os 30 minutos iniciais, foram verificadas reações comportamentais estimulantes, tais como reação de fuga, aumento da

frequência respiratória, movimentos estereotipados, contorções abdominais e agressividade (Tabela 1). Estes e outros tipos de comportamentos diminuíram drasticamente após os 30 minutos iniciais da administração de todas as doses, onde os animais apresentaram prostração, sonolência e diminuição da frequência respiratória. Com isso, sugere-se que o extrato de *P.amboinicus* possui uma ação estimulante seguido por uma ação depressora sobre o Sistema Nervoso Central.

As administrações intraperitoneais das doses de 150, 250 e 350 mg.kg⁻¹ do EH das folhas de *P.amboinicus* diminuíram significativamente o edema de pata em todas as doses testadas, conforme as figuras 3. Após a segunda hora, as doses de 250 e 350 mg.kg⁻¹ diminuíram significamente o volume do edema de pata até a sexta hora de observação. O mesmo não foi observado pela Indometacina e na dose de 150 mg.kg⁻¹ do EH de *P.amboinicus*, cuja ação se deu após a terceira hora de observação. O maior percentual de inibição do edema foi de 32,7% na terceira hora com a dose de 350 mg.kg⁻¹ e na sexta hora com um percentual de inibição superior a 41% na dose de 250 mg.kg⁻¹ do EH de *P.amboinicus*, conforme as figuras 1 e 2. Os demais percentuais variaram de 20% a 34% em todas as doses testadas do referido extrato. Curiosamente, o menor percentual de inibição foi obtido pela Indometacina, com 10 % de inibição do edema após a sexta hora de observação (figura 3).

Nas administrações intraperitoneais das doses de 150, 250 e 350 mg.kg⁻¹ do EH de *P.amboinicus* não foi observado inibição do edema (figura 4).

DISCUSSÃO

O estudo toxicológico pré-clínico do EH de *P.amboinicus* nas doses de 500 a 3800 mg.kg⁻¹ (i.p) e 4000 mg.kg⁻¹ (v.o) apresentou baixa toxicidade, sem nenhum óbito, descartando uma possível determinação da DL₅₀. Este resultado corrobora com Parra et al., (2001) onde o extrato metanólico das folhas de *P.amboinicus* apresentou pouca toxicidade em estudo *in vivo*, com camundongos, e em estudo *in vitro*, com artemia salina. Em contrapartida, Parra; Ruiz. (2001) mostrou que o óleo essencial de *P.amboinicus* possui uma ação genotóxica significativa e dose-dependente nos ensaios de

segregação mitótica frente ao fungo *Aspergillus niludans* D-30. Tais efeitos não foram observados em ensaios de indução de micronúcleo na medula óssea de ratos.

Desta maneira, os resultados desta pesquisa demonstram que o extrato hidroalcoólico de *P. amboinicus* é praticamente atóxico quando comparados com o óleo essencial no ensaio supracitado.

A triagem farmacológica do EH de *P. amboinicus* indicou uma forte ação estimulante seguida de uma ação depressora sobre o Sistema Nervoso Central. Rodríguez et al., (1999) descreveu o perfil neurofarmacológico do extrato aquoso de *P. amboinicus* indicando um efeito antiepileptogênico em modelos de “Kindling” induzidos por lidocaína e Bu Wong et al., (1997) relatou um efeito pontencializador de *P. amboinicus* de estereotipias induzidas por anfetamina. Acredita-se que *P. amboinicus* aja inativando o mecanismo de recaptura intraneuronal das catecolaminas, semelhante aos antidepressivos (Villate et al., 1999).

As administrações intraperitoneais do EH de *P. amboinicus* indicam uma ação antiinflamatória significativa, inclusive maior (porém não significativo) que o fármaco padrão Indometacina. Nas administrações orais, o EH de *P. amboinicus* não apresentou ação antiinflamatória durante o tempo de observação. Possivelmente, o EH de *P. amboinicus* possui uma absorção lenta no trato gastrointestinal.

O edema induzido por carragenina é um modelo bifásico, com vários mediadores atuando em seqüência para produzir a resposta inflamatória. Na fase inicial (0-1h) ocorre liberação de histamina, serotonina e bradicinina. A fase posterior (1-6h) está correlacionada com elevada produção de prostaglandinas, ativação da COX-2 e liberação de NO (Lima, 1999 apud Silva, 2005). De acordo com os resultados, a ação inibitória do edema de pata parece atuar na fase final da resposta inflamatória induzida por carragenina, uma vez que o efeito foi observado a partir da segunda hora da administração das doses de *P. amboinicus*.

Esta ação inibitória do edema de pata pode estar relacionada à presença de flavonóides, como quercetina e luteolina presentes no EH de *P. amboinicus*. Estudos demonstram que o extrato das folhas,

tanto aquoso quanto os de flavonóides de *P. amboinicus* possuem um poderoso efeito antioxidante, sendo o extrato de flavanóides superior ao efeito do α -tocoferol, um bioantioxidante universal (Sálman et al, 1996). Chandra et al., 2002, mostraram que moléculas antioxidantes como o α -tocoferol diminuem a atividade enzimática da fosfolipase A₂ (PLA₂) isolada e, conseqüentemente, diminui sua atividade inflamatória. O exato mecanismo de ação dos flavonóides sobre essas enzimas não está elucidado, porém, acredita-se que haja uma inibição, obstrução do sítio catalítico e modificações na PLA₂, sem levar a um desenovelamento total (Iglesias et al, 2006). Outros estudos reportam a ação dos flavonóides como inibidor da cadeia de ciclooxigenase e 5-lipooxigenase do processo inflamatório através da inibição da síntese de eicosanóides, modificações na integridade das proteínas de membrana, tal como a 3-monooxigenase quinase, que age como transdutora de sinal para fatores de crescimento e inibição da degranulação dos neutrófilos (Nijveldt et al., 2001).

Portanto, o EH das folhas de *P. amboinicus* apresentou baixa toxicidade, porém, outros estudos toxicológicos pré-clínicos como embriofetotoxicidade e ensaios toxicogênicos devem ser realizados com o extrato referido para que se comprovem a ausência de efeitos tóxicos. Os resultados indicaram uma forte ação sobre o SNC e uma ação significativa antiinflamatória, respaldando o seu uso popular como antiinflamatório.

AGRADECIMENTOS

Ao Agrônomo Fernando Antonio C. Viana, coordenador do Horto Medicinal do LTF/UFPE. Ao técnico do laboratório Raimundo Nonato da Silva LTF/UFPE. A agência financiadora desta pesquisa CNPq.

REFERÊNCIAS

Acosta LMR, Fiebtes V, Rodríguez C. 1998. Instructivo técnico del *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Rev Cubana Plant Med* 3:51-53;

Aguiar FB 2004. *Ensaio clínico de fase II para avaliação de um fitoterápico composto (Shinus terebinthifolius Raddi; Plectranthus amboinicus Lour., e Eucalyptus globulus Labill)*. João Pessoa, 438p. Tese de Doutorado – Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba.

Bu Wong M., Rodriguez SNM, Pérez MDF, Gutiérrez ND, Rodríguez MTB, Pérez-Saad H 1997. Establecimiento del Kindling por lidocaína en el mono verde. Estudio preliminar de la acción del *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (orégano francés). *Rev Cubana Plant Med* 22: 45-47.

Chandra V, Jasti J, Kaur P, Betzel C, Srinivasan A, Singh TPJ 2002. First structural evidence of a specific inhibition of phospholipase A2 by alpha-tocopherol (vitamin E) and its implications in inflammation: crystal structure of the complex formed between phospholipase A2 and alpha-tocopherol at 1.8 Å resolution. *Mol Biol* 5:320215-22;

Iglesias CV, Marangoni, Aparício R, Camargo EA, Antunes E, Toyama MH 2004. Efeito de flavonóides na estrutura e atividade inflamatória da PLA2 de *Crotalus durissus cascavella*. Disponível em: www.prp.unicamp.br. Acessado em dez 2006.

Karber G, Behrens B 1964. *Statistical Methods in Biological Assays*. London: Ed. Griffin Ch. and C;

Lukhoba CW, Simmonds MSJ, Paton AJ 2005. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. *J Ethnopharmacol* 103: 1–24;

Malone RA. 1977. Pharmacological approaches to natural products screening and evaluation. In: *New Natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity*, ed. By H. Warner and P. Wolf, Springer-Verlag, Berlin, p. 24-53;

Napralert 2003. Natural Products Alert Program for Collaborative Research in the Pharmacological Sciences (PCRPS). A world Health Organization Collaborating Centre for Traditional Medicines. College of Pharmacy, University of Illinois, Chicago, EUA;

Nijveldt RJ, Nood E, Hoorn DEC, Boelens PG, Norren K, Leeuwen PAM 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74:418–25;

Parra V, Ruiz RA 1999. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Orégano Francês). Estudo toxicogénico de um extracto fluido y del aceite essencial. *Rev Cubana de Plant Med* 2: 68-73;

Parra AL, Yhebra RS, Sardinans IG, Buela I 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Rev Cubana de Plant Med* 5:395-400;

Rodríguez MTB, Pérez MDF, Villate ML, Alonso NL, González MEA, Pérez-Saad H 1999. Perfil Neurofarmacológico del *Plectranthus amboinicus* (orégano francês). Potenciación de las estereotipias inducidas por anfetamina. *Rev Cubana Plant Med* 4: 15-17;

Sálman JGD, Jimenez TEG, Castilho RM 1996. Efecto antioxidante de los extractos fluido e de flavanóides del *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (Orégano Francés). *Rev Cubana de Plant Med* 2: 27-30;

Silva MG, Oliveira FS, Quitans – Jr. LJ, Oliveira TML, Diniz MFFM 2005. Investigação do Efeito Analgésico Central e Antiinflamatorio de *Conocliniopsis prasiifolia* (DC) R.M. King & H. Robinson em Roedores. *Acta Farm Bonaerense* 24: 533-7;

Veiga Jr. VF, Pinto AC, Maciel MAM 2005. Medicinal plants: safe cure? *Qu m Nova* 28:3;

Villate ML, Pérez-Saad H, Pérez MDF, Sarr a EG, Castillo RM, Rodríguez MTB 1999. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (orégano franc s): efecto antimuscar nico y potenciaci n de la adrenalina. *Rev Cubana Plant Med* 1:29-32;

Winter CA, Rishley EA, Nuss GW 1962. Carrageenan induced edema en hind paw as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol Med* 3: 544-547;

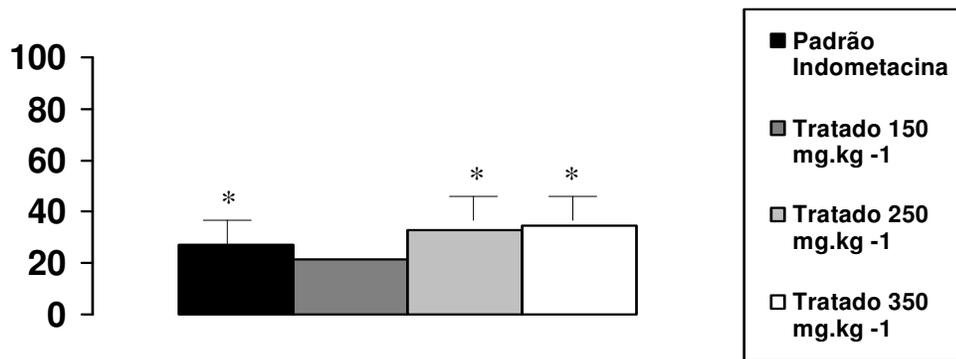


Figura 1- Percentagem (%) da ação antiedematogênica, na terceira hora após a administração do EH das folhas de *P. amboinicus* (150, 250 e 350 mg.kg⁻¹), por via intraperitoneal, no modelo de pata induzido por carragenina em ratos Wistar adultos.

*P < 0,05 comparado os grupos tratados com o controle que recebeu apenas solução salina a 0,9%. Teste “t” de Student (n = 5/grupo).

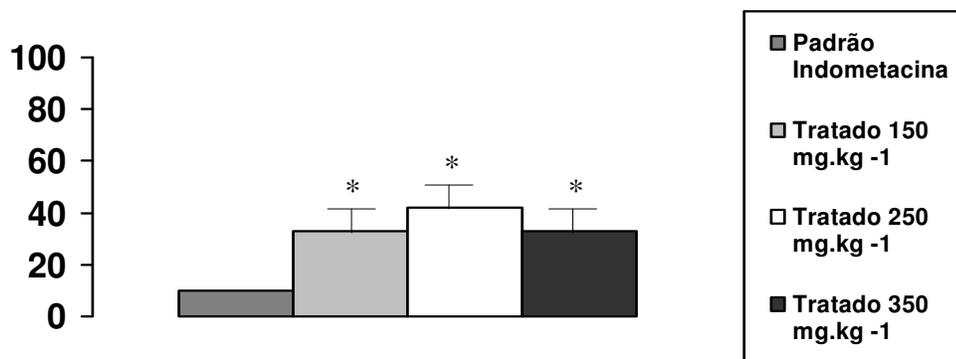


Figura 2- Percentagem (%) da ação antiedematogênica, na sexta hora após a administração do EH das folhas de *P. amboinicus* (150, 250 e 350 mg.kg⁻¹), por via intraperitoneal, no modelo de pata induzido por carragenina em ratos Wistar adultos.

*P < 0,05 comparado os grupos tratados com o controle que recebeu apenas solução salina a 0,9%. Teste “t” de Student (n = 5/grupo).

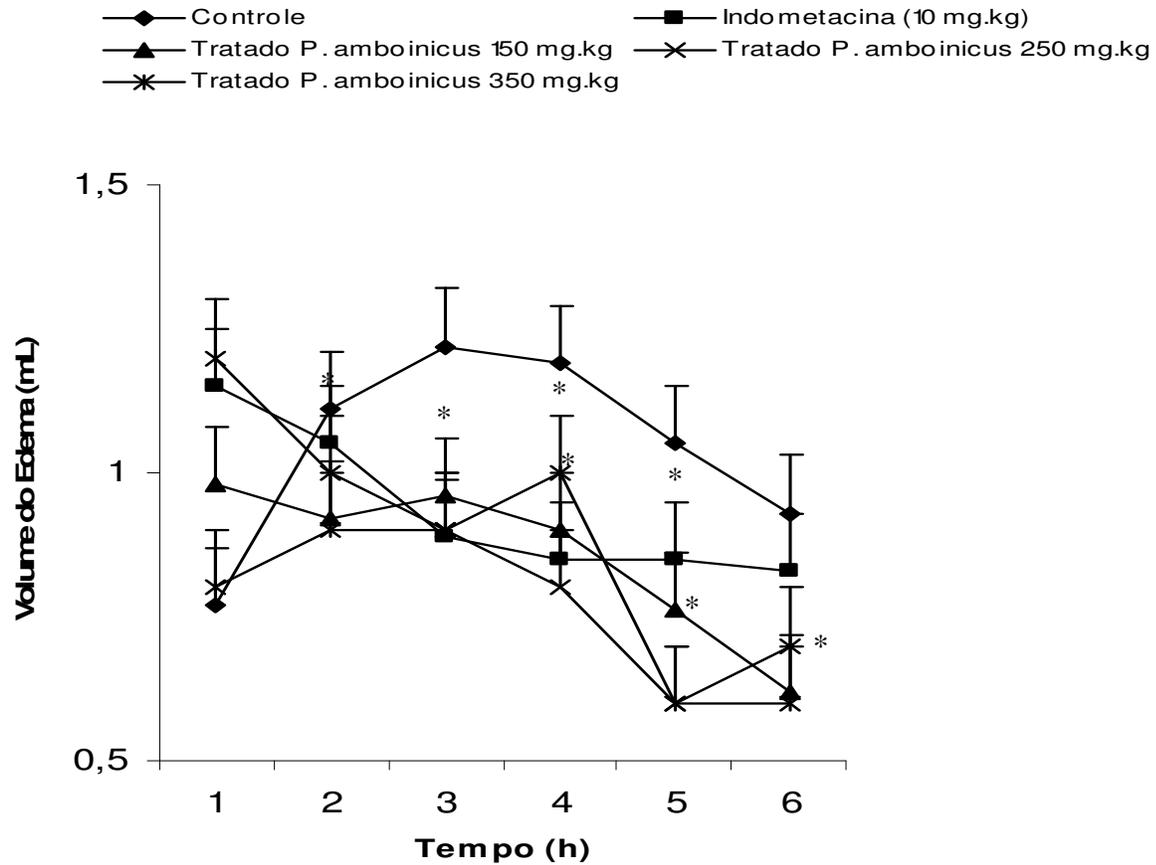


Figura 3- Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. amboinicus* nas doses de 150, 250 e 350 mg.kg⁻¹, administrados por via intraperitoneal no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos Wister adultos. Os valores representam a média \pm desvio padrão.

*P < 0,05 comparado os grupos tratados com o controle que recebeu apenas solução salina a 0,9%. Teste “t” de Student (n = 5/grupo).

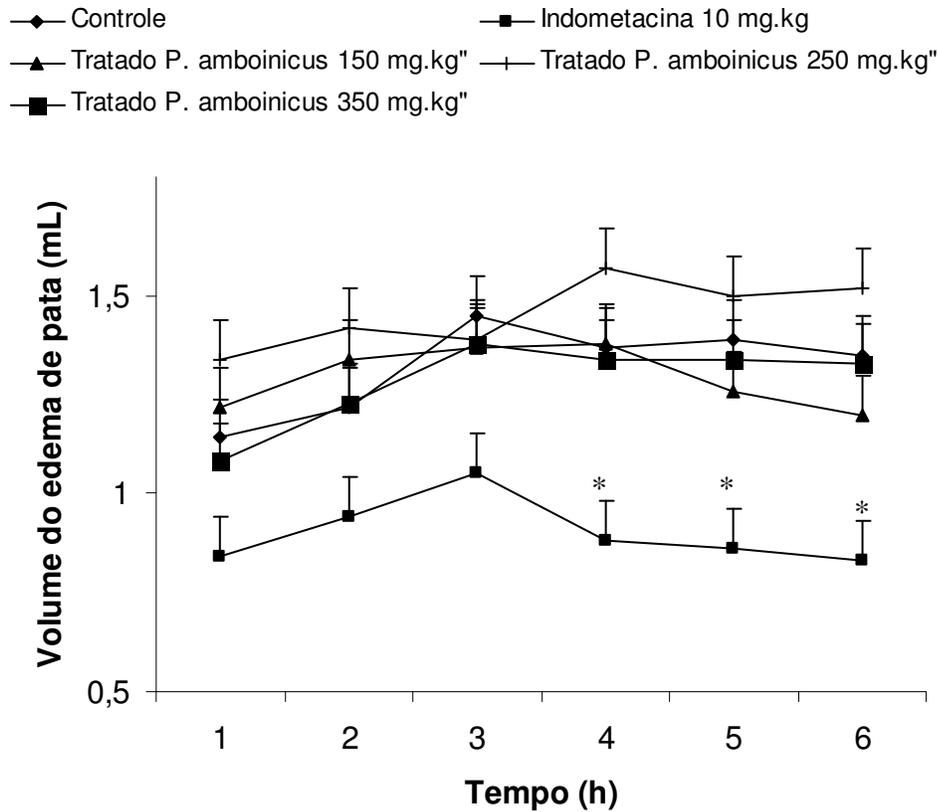


Figura 4- Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. amboinicus* nas doses de 150, 250 e 350 mg.kg⁻¹, administrados por via oral, no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratas Wister adultas. Os valores representam a média ± desvio padrão.

*P < 0,05 comparado os grupos tratados com o controle que recebeu apenas solução salina a 0,9%. Teste “t” de Student (n = 5/grupo).

Tabela 1- Efeitos farmacológicos dos ensaios preliminares de toxicidade do EH das folhas de *P. amboinicus*

Ação Farmacológica/Dose mg.kg ⁻¹	500	750	1125	1690	2535	3800	4000
	V. I. P	V. O					
SNC Estimulantes							
↑ Frequência Respiratória	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Agitação	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Piloereção	+	+	++	++	+++	+++	+++
Exoftalmia	++	++	+	+	-	-	++
Mov. Estereotipados	+++	+++	+++	++	++	++	+++
Mov. Vibrissas	+++	+++	-	-	-	-	++
Convulsão	-	-	-	+++	-	-	-
Tremores	++	+++	+++	+++	-	-	+++
Postura de ataque	+++	+++	++	++	-	-	-
Saltos	-	+++	++	++	-	-	-
Depressores							
Dispnéia	+	-	-	-	-	-	-
Sonolência	-	-	-	-	-	-	-
↓ Frequência Respiratória	-	-	-	-	-	-	-
Alteração de Marcha	-	-	-	-	-	-	-
SN Autônomo							
Diarréia	-	-	-	-	-	-	-
Cianose	-	-	-	-	-	-	-
Salivação	-	-	-	-	-	-	-
Lacrimejamento	-	-	-	-	-	-	-
Contorções abdominais	+++	+++	++	+++	++	++	-
Micção	-	-	-	-	-	-	-
Agressividade	+++	+++	++	+++	+	+	-
Diurese	+	++	++	+	-	-	++
Outros							
Reação de fuga	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Distensão abdominal	+++	+++	+	+++	++	++	-
Espasmos	+	+	+	+++	+	+	+++
Palidez	+++	-	-	-	-	-	-

+++ Efeito intenso; ++ Efeito moderado; + Efeito leve; - Ausência de efeito

(Malone, 1977)



7. ARTIGO IV

Atividade Antineoplásica e Carcinogênica do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae) em Modelos Experimentais de Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich

Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel^{1*}, Jackeline Gomes da Silva¹, Danielli Cândida Oliveira¹, Ana Ruth Sampaio Grangeiro¹, Cynthia Maria Pontes de Lima¹, Rinalda Araújo Guerra de Oliveira², Ivone Antônia de Souza³

1 Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Arthur de Sá, S/N, Cidade Universitária, 50740-521, Recife, PE, Brasil,

2 Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Federal da Paraíba, Av. Castelo Branco, S/N, Cidade Universitária 58051-900, João Pessoa, PB, Brasil,

3 Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Arthur de Sá, S/N, Cidade Universitária, 50740-521, Recife, PE, Brasil,

RESUMO

“Atividade antineoplásica e carcinogênica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae) nos modelos de Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich”

Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng, é comumente usado na medicina popular no Brasil como antiinflamatório, analgésico e antipirético. O presente estudo avaliou a atividade antineoplásica do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. amboinicus* nos modelos experimentais de Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich. Os resultados mostram que o extrato de *P. amboinicus* apresenta uma diminuição na média dos pesos dos tumores de Sarcoma 180 nas doses de 100, 150, 250 e 350 mg.mL⁻¹, sendo a maior dose com redução de cerca de 66%. O mesmo foi observado nos tumores de Carcinoma de Ehrlich, porém, a menor dose inibiu cerca de 74% dos pesos médios dos tumores. O EH de *P. amboinicus* na concentração de 350 mg.mL⁻¹ apresentou um efeito carcinogênico. Portanto, o EH das folhas de *P. amboinicus* apresentou um efeito antineoplásico frente aos modelos experimentais Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich, porém, em altas concentrações o extrato atua como um carcinógeno.

Unitermos: *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, Atividade Antineoplásica, Carcinogênese.

ABSTRACT

“Antineoplastic and carcinogenic activity of the hydroalcoholic extracts of leaves *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae) in the models of 180 Sarcoma and Carcinoma of Ehrlich”. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, is commonly used in the folk medicine in Brazil as anti-inflammatory, analgesic and antipyretic. The present study it evaluated the antineoplastic activity of the hydroalcoholic extract of leaves *P. amboinicus* in the experimental models of 180 Sarcoma and Carcinoma of Ehrlich. The results show that the extract of *P. amboinicus* presents a reduction of the average of the weights of the tumors of Sarcoma 180 in the doses of 100, 150, 250 and 350 mg.mL⁻¹, being the high concentration with reduction of about 66%. The same it was observed in the tumors of Carcinoma of Ehrlich, however, the concentration low inhibited about 74% of the average weights of the tumors. The EH of *P. amboinicus* in the concentration of 350 mg.mL⁻¹ presented a carcinogenic effect. Therefore, the EH of leaves of *P. amboinicus* presented a antineoplastic effect front to the experimental models Sarcoma 180 and Carcinoma of Ehrlich, however, in high concentrations the extract acts as a carcinogen

.Key-words: *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, Antineoplastic Activity, Carcinogenic.

INTRODUÇÃO

Neoplasias malignas conhecidas como cânceres resultam de alterações nos genes reguladores críticos que controlam a proliferação, diferenciação e a sobrevivência celular. Estas alterações levam a um crescimento celular descontrolado, com a capacidade de invadir tecidos e órgãos, vizinhos ou mais distantes(Donnici et al, 2005).

O câncer é um dos maiores representantes nos índices de mortalidade no mundo, acometendo cerca 6 milhões de pessoas a cada ano. No Brasil, as estimativas no ano de 2006 apontaram cerca de 472.050 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção de pele não melanoma, são os de próstata e pulmão no sexo masculino e mama e colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (INCA, 2006).

Dados epidemiológicos sugerem que o desenvolvimento de muitos dos cânceres está correlacionado ao estilo de vida associado a outros fatores principalmente como a dieta, que pode agir como um carcinogéno ou quimiopreventivo (Hirose et al, 1995). Muitos vegetais usados na medicina popular vêm sendo pesquisados na busca de drogas com ação quimiopreventiva.

Dados epidemiológicos de três décadas apontaram um efeito quimiopreventivo das frutas e dos vegetais nos indivíduos que consumiam maiores quantidades comparados com aqueles com pouca consumação. Esta ação inibitória do câncer através de uma variedade de fitoconstituintes foi confirmada em diferentes modelos de experimentação animal e, a partir disso, vem sendo elaboradas estratégias de prevenção do câncer através da dieta (Singletary, 2000).

Plectranthus amboinicus ou *Coleus amboinicus* é uma espécie nativa da Ásia e distribuída por toda a América. É popularmente conhecida como hortelã da folha grossa, orégano e orégano francês, sendo muito utilizada na medicina popular como analgésico, antiinflamatório e antimicrobiano.

Investigações farmacológicas prévias mostraram que *P. amboinicus* possui propriedades citotóxicas, genotóxicas (Parra; Ruiz, 1999), antibacteriana, anti-viral (Napralert, 2003), antiepiléptica, antioxidante (Sálman et al, 1996) e antidepressora, (Rodríguez et al, 1999).

P. amboinicus possui em sua composição química óleos essenciais, açúcares redutores, monoterpenos (carvacrol, timol) triterpenos, esteróides e fenóis (Acosta et al., 1998). Apresentam também terpenos, taninos e flavonóides (Matick apud Aguiar, 2004). Dentre os flavonóides, *P. amboinicus* possui a quercetina, luteolina, ácido caféico todas estas moléculas com conhecida atividade quimiopreventiva. Além disso, estudos demonstram que o extrato de flavonóides e o aquoso de *P. amboinicus* possuem um poderoso efeito antioxidante na inibição da formação de produtos reativos ao ácido tiubarbitúrico, sendo o extrato de flavonóides superior ao efeito do α -tocoferol (Salmán et al., 1996). Tais fitoconstituintes antioxidantes são importantes uma vez que reagem com as espécies reativas de oxigênio, protegendo estruturas celulares críticas como membranas, proteínas e DNA. Com base nos dados supracitados, o presente artigo avaliou uma possível atividade antineoplásica extrato hidroalcoólico das folhas de *P. amboinicus* nos modelos experimentais *in vivo* de Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

As folhas de *P. amboinicus* foram coletadas em Setembro de 2005 no horto do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba – UFPB. Foi elaborada uma exsicata sendo posteriormente depositada no Herbário IPA – Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, com o código JPA 65501. A identificação do material foi feita pela Dra. Rita de Cássia A. Pereira.

Preparação do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. amboinicus*

Para a obtenção do extrato hidroalcoólico (EH), 2.74 kg de fragmentos das folhas de *P. amboinicus* foram submetidos a um processo de maceração, com etanol a 70% (v/v), em temperatura ambiente por um período de 72 horas. Em seguida, o material foi filtrado e concentrado a vácuo, em um rotavapor, fornecendo desta maneira um resíduo com rendimento de 32.5g.

Animais

Para a investigação da atividade antineoplásica foram utilizados camundongos albinos Swiss fêmeas (*Mus musculus*), com aproximadamente 60 dias de nascidos e peso entre 25 e 35g, divididos em grupos de cinco animais por gaiola de polipropileno sendo mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo 12 horas claro/escuro) e temperatura ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$), recebendo água *ad libitum*. Os animais foram provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE.

Avaliação da Atividade Antineoplásica

A implantação de tumores sólidos de Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich foi realizada segundo a técnica descrita por Stock et al (1954) e modificada por Komiyama (1992). O tratamento iniciou 48 horas após o implante com a administração intraperitoneal do EH das folhas de *P. amboinicus* nas concentrações de 100, 150, 250 e 350 mg.kg⁻¹ nos grupos tratados, Metotrexato (10 mg.kg⁻¹) no grupo padrão e solução salina a 0,9% nos grupos controles. As doses foram administradas (v.i.p) e os pesos dos animais foram mensurados diariamente durante um período de oito dias. No nono dia, os animais foram pesados, eutanasiados e os tumores extirpados. A inibição do crescimento tumoral foi calculada em comparação ao grupo controle após pesagem dos tumores.

Tratamento Estatístico

Os dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e teste “t” de Student para avaliar as diferenças entre os grupos controles e tratados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antineoplásica do EH das folhas de *P. amboinicus* foi testada nos modelos experimentais Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich. Nos ensaios frente ao Sarcoma 180, os animais tratados com o EH das folhas de *P. amboinicus* apresentaram uma diminuição na média dos pesos dos tumores em relação ao grupo controle, porém apenas a maior dose (350 mg.kg⁻¹) foi significativa, com um percentual de inibição superior a 66%. Nas doses de 100, 150 e 250 mg.kg⁻¹ houve uma discreta inibição dos pesos dos tumores, com percentuais de inibição que variaram 44 à 47% (Figura 6).

A análise macroscópica dos animais do grupo tratado com o referido extrato revelou alterações como esplenomegalia, hepatomegalia e ascite na cavidade abdominal. Não houve diferenças estatisticamente significante nos pesos dos animais durante os oito dias de tratamento. Os animais do

grupo padrão tratados com Metotrexato (10 mg.kg^{-1}) apresentaram uma redução significativa dos pesos médios dos tumores, com um percentual de 100% de inibição.

Nos ensaios com os animais portadores do Carcinoma de Ehrlich houve uma redução na média dos pesos dos tumores dos grupos tratados com o EH das folhas de *P. amboinicus* em relação ao grupo controle, porém apenas a menor dose (100 mg.kg^{-1}) foi significativa, com um percentual de inibição de 74%. Nas doses de 150 e 250 mg.kg^{-1} houve uma discreta inibição dos pesos dos tumores, com percentuais de inibição de 61 e 27%, respectivamente (Figura 7). Após análises macroscópicas, observou-se a presença de esplenomegalia, hepatomegalia e alguns animais apresentaram ascite na cavidade abdominal. Não houve diferenças estatisticamente significante nos pesos dos animais durante os oito dias de tratamento.

O grupo tratado com a dose de 350 mg.kg^{-1} do EH de *P. amboinicus* apresentou um efeito carcinogênico, com as médias dos pesos dos tumores 25% maior, porém não significativo, em relação às médias dos tumores do grupo controle (Figura 8). Os animais do grupo padrão tratados com Metotrexato (10 mg.kg^{-1}) apresentaram um índice de inibição superior a 97%.

A quimioprevenção pode ser definida como a prevenção, inibição ou cura dos cânceres carcinogênicos e sarcomagênicos induzidos por um ou mais constituintes químicos, incluindo os compostos presentes na dieta. Os flavonóides são compostos fenólicos encontrados em muitos vegetais, possuindo uma grande variedade de atividades biológicas, incluindo a prevenção do câncer. Estudos laboratoriais, epidemiológicos e clínicos indicam que os flavonóides possuem um importante efeito quimiopreventivo e quimioterápico (Wang et al, 2003).

A triagem fitoquímica do EH das folhas de *P. amboinicus* relatou a presença de flavonóides como o ácido caféico, quercetina, luteolina e rutina (Gurgel et al, 2007). A ação antineoplásica do EH de *P. amboinicus* observada neste estudo por estar correlacionada à presença destes flavonóides que podem agir sinergicamente na redução dos tumores de Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich. Estudos relatam que tanto a quercetina como rutina atuam como quimiopreventivo contra uma variedade de

modelos experimentais bloqueando a fase de promoção do câncer em animais, incluindo o azoximetano (AOM) indutor de neoplasia colorretal em ratos, dimetilbenzeno antracene (DMBA) indutor de câncer de mama e de pele em ratos (Yang, 2000) e o acetato de tetradecanoilforbol (TPA) indutor de câncer de pele em camundongos (Hirose et al, 1995).

Alguns mecanismos de ação destes compostos fenólicos têm sido identificados como a inativação de carcinógenos, indução de apoptose, inibição da proliferação celular, e neutralização das espécies reativas de oxigênio (Wang et al, 2003).

Também foram encontrados no EH de *P. amboinicus* monoterpénóides (carvacrol e timol), sesquiterpenóides e diterpenóides, terpenóides (β -sitosterol) e derivados cinâmicos (Gurgel et al, 2007). Estes fitoconstituintes também atuam como quimiopreventivos em cânceres carcinomatosos e sarcomatosos agindo como indutores de apoptose (Bhattacharya et al, 2001; Akayo et al, 2003).

Além do efeito quimiopreventivo, observou-se que o EH de *P. amboinicus* apresenta um efeito carcinogênico na maior concentração do extrato testado. Este efeito pode ser justificado pela presença da quercetina no extrato, que, além da atividade quimiopreventiva, possui uma ação mutagênica. Estudos *in vitro* e *in vivo* relatam que a quercetina induz câncer de intestino e bexiga (Hirose et al, 1995; Dihal et al, 2005). A ação da quercetina como um pro-carcinógeno ou anti-carcinógeno é ainda incerta.

Portanto, o EH das folhas de *P. amboinicus* apresentou uma inibição no crescimento tumoral frente aos modelos experimentais Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich. Porém, outros estudos *in vivo* e *in vitro* devem ser realizados uma vez que o referido extrato pode agir como um carcinógeno, oferecendo um perigo à população já que esta espécie é muito utilizada como antimicrobiano e antiinflamatório.

AGRADECIMENTOS

Ao Agrônomo Fernando Antonio C. Viana, coordenador do Horto Medicinal do LTF/UFPE. Ao técnico do laboratório Raimundo Nonato da Silva LTF/UFPE. A agência financiadora desta pesquisa CNPq.

REFERÊNCIAS

Acosta LMR, Fuebtes V, Rodríguez C. 1998. Instructivo técnico del *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Rev Cubana Plant Med* 3:51-53;

Aguiar FB 2004. *Ensaio clínico de fase II para avaliação de um fitoterápico composto (Shinus terebinthifolius Raddi; Plectranthus amboinicus Lour., e Eucalyptus globulus Labill)*. João Pessoa, 438p. Tese de Doutorado – Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba;

Akao Y, Maruyama H, Matsumoto K, Ohguchi K, Nishizawa K, Sakamoto T, Araki Y, Mishima S, Nozawa Y. 2003. Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. *Biol Pharm Bull* 26:1057-9;

Bhattacharya RK, Roy M, Taraphdar AK 2001. Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention. *Current Science* 80: 1387-96;

Dihal AA, Woutersen RA, Ommen BV, Rietjens IMCM, Stierum RH 2005. Modulatory effects of quercetin on proliferation and differentiation of the human colotectal cell line Caco-2. *Cancer Letters* 238:248-259;

Donnici CL, Montanari CA, Reina LCB, Andrei L, Almeida VL 2005. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo- celular específicos e ciclo celular não específico que interagem com o DNA: Uma introdução. *Quim. Nova* 28:118-129;

Gurgel APAD, Oliveira RAG, Pereira MRV, Xavier HS, Souza IA 2007. Screening antimicrobiano e triagem fitoquímica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Plectranthus amboinicus* Lour. Spreng (Lamiaceae). *Brasiliam Journal of pharmacognosy*. (Em submissão).

Komiyma K, Funayama S 1992. Antitumor agents. In: Omura S. (edt). The search for bioactive compounds from microorganisms. *Spriger-Verlag* 79-97;

Hirose M, Akagi, K, Hoshiya T, Mizoguchi Y, Ito N, Shirai T 1995. Modulating effects of ellagic acid, vanillin and quercetin in a rat médium term multi-organ carcinogenesis model. *Cancer Letters* 94: 113-121;

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: Acessado em Jan 2006.

Napralert 2003. Natural Products Alert Program for Collaborative Research in the Pharmacological Sciences (PCRPS). A world Health Organization Collaborating Centre for Traditional Medicines. College of Pharmacy, University of Illinois, Chicago, EUA;

Parra V, Ruiz RA 1999. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Orégano Francês). Estúdio toxicogénico de um extracto fluido y del aceite essencial. *Rev Cubana de Plant Med* 2: 68-73;

Rodríguez MTB, Pérez MDF, Villate ML, Alonso NL, González MEA, Pérez-Saad H 1999. Perfil Neurofarmacológico del *Plectranthus amboinicus* (orégano francés). Potenciación de las estereotipias inducidas por anfetamina. *Rev Cubana Plant Med* 4: 15-17;

Sálman JGD, Jimenez TEG, Castilho RM 1996. Efecto antioxidante de los extractos fluido e de flavanóides del *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (Orégano Francés). *Rev Cubana de Plant Med* 2: 27-30;

Singletary K 2000. Diet, natural products and cancer chemoprevention. *The J of Nutrition* 465-6;

Stock CC, Sugiura K 1954. The Effect of Phosphoramides on the Growth of a Variety of Mouse and Rats Tumors. *Cancer Research* 2: 38-50;

Wang H, Qial Z, Ren W. 2003. Flavonoids: Promising anticancer agents. *Med res rev* 23: 519-534;

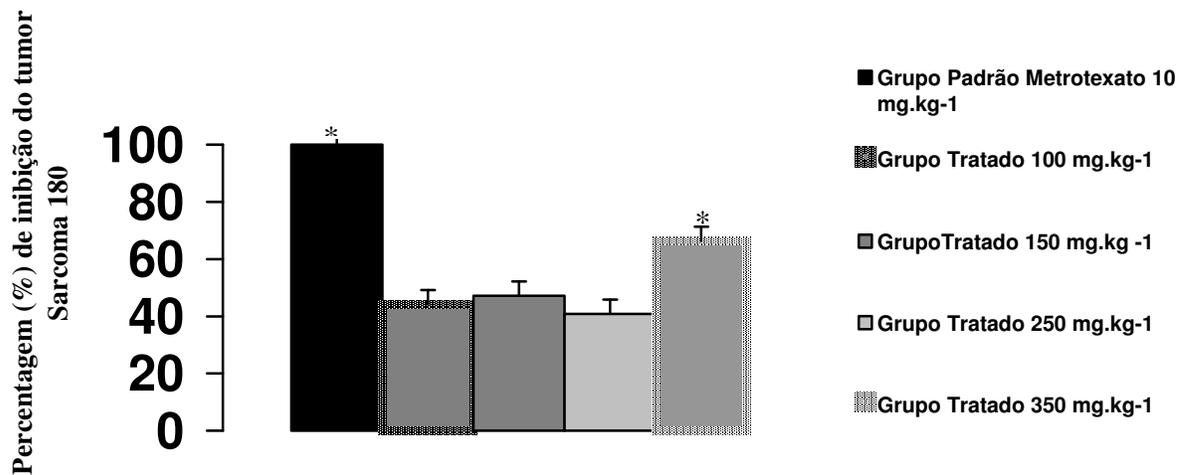


Figura 6- Percentagem (%) de inibição da média dos pesos dos tumores em animais tratados com o EH das folhas de *P. amboinicus*, administrados por via intraperitoneal, sobre o modelo experimental de Sarcoma 180 em camundongos fêmeas adultas. Os valores representam a média \pm desvio padrão.

* $P < 0,05$ comparado os grupos tratados com o controle que recebeu apenas solução salina a 0,9%. Teste “t” de Student ($n = 5$ /grupo).

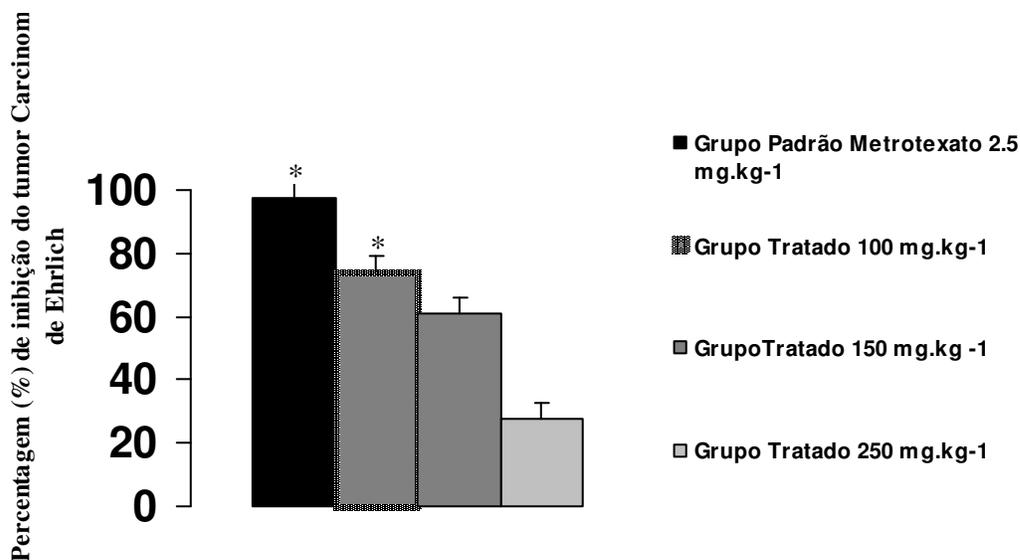


Figura 7- Percentagem (%) de inibição da média dos pesos dos tumores em animais tratados com o EH das folhas de *P. amboinicus*, administrados por via intraperitoneal, sobre o modelo experimental de Carcinoma de Ehrlich em camundongos fêmeas adultas. Os valores representam a média \pm desvio padrão.

* $P < 0,05$ comparado os grupos tratados com o controle que recebeu apenas solução salina a 0,9%. Teste “t” de Student ($n = 5$ /grupo).

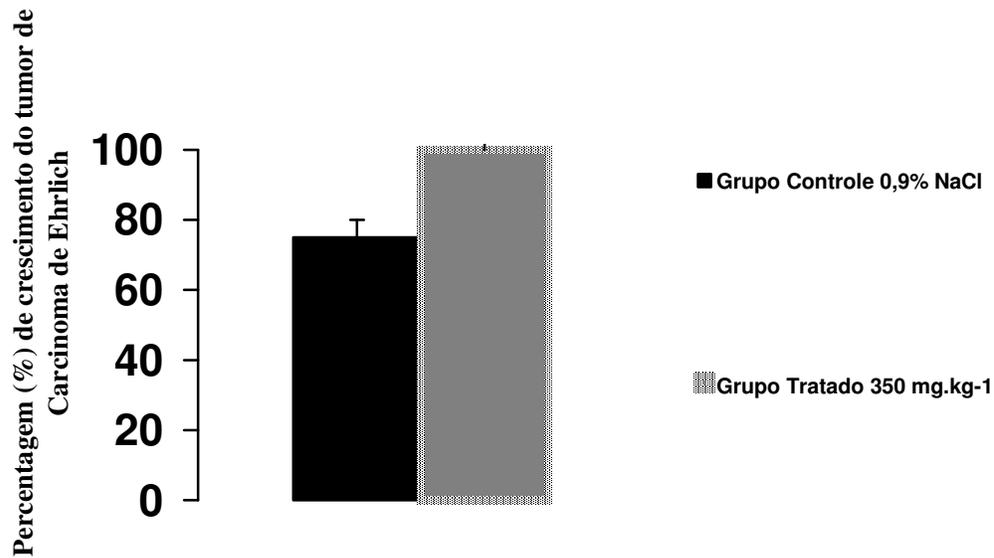


Figura 8- Percentagem (%) de crescimento da média dos pesos dos tumores de animais tratados com EH das folhas de *P. amboinicus*, administrados por via intraperitoneal, sobre o modelo experimental de Carcinoma de Ehrlich em camundongos fêmeas adultas. Os valores representam a média \pm desvio padrão.

*P < 0,05 comparado os grupos tratados com o controle que recebeu apenas solução salina a 0,9%. Teste “t” de Student (n = 5/grupo).



8. CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

Os ensaios fitoquímicos realizados no extrato hidroalcoólico das folhas de *P. amboinicus* evidenciaram a presença de flavonóides, triterpenóides, monoterpénóides, sesquiterpenóides, diterpenóides, esteróides e derivados cinâmicos.

Os resultados da atividade antimicrobiana concluem que o extrato hidroalcoólico das folhas de *P. amboinicus* apresenta ação antibacteriana contra cepas gram-positivas, especialmente *Staphylococcus aureus*. Os resultados indicam uma potente atividade antibacteriana do frente às linhagens de *S. aureus* multirresistentes. A curva de mortalidade evidenciou uma ação bactericida e bacteriostática do extrato nas primeiras horas de exposição. No entanto, o extrato não apresentou ação frente aos microrganismos gram-negativos e fungos leveduriformes.

EH das folhas de *P. amboinicus* apresentou baixa toxicidade, com uma forte ação sobre o SNC e uma ação significativa antiinflamatória, respaldando o seu uso popular como antiinflamatório.

Os resultados da atividade antineoplásica nos modelos experimentais Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich apontam uma redução das médias dos pesos dos tumores nos grupos tratados com o EH das folhas de *P. amboinicus*, indicando um efeito quimiopreventivo. Porém, deve-se ressaltar que concentração elevada do extrato pode agir como um carcinógeno, oferecendo um perigo à população, já que esta espécie é muito utilizada como antimicrobiano e antiinflamatório.



9. REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

ABDEL-MOGIB, M.; ALBAR, H.A.; BATTERJEE, S.M... Chemistry of the Genus *Plectranthus*. **Molecules**, 7:271-30. 2002.

ACOSTA L. M. R.; FUEBTES V.; RODRÍGUEZ, C. Instructivo técnico del *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Rev. Plantas Medicinales*. 3:51-53. 1998.

AGUIAR, F. B. **Ensaio clínico de fase II para avaliação de um fitoterápico composto (*Shinus terebinthifolius* Raddi; *Plectranthus amboinicus* Lour., e *Eucalyptus globulus* Labill)**. 2004. 438p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Centro de Ciências da Saúde. Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa;

AKAO, Y.; MARUYAMA, H.; MATSUMOTO, K.; OHGUCHI, K.; NISHIZAWA, K.; SAKAMOTO, T.; ARAKI, Y.; MISHIMA, S.; NOZAWA, Y. Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. **Biol Pharm Bull** 26:1057-9. 2004.

ALVIN, J. M., IBRAHIM, J. S. Modulatory effect of *Plectranthus amboinicus* Lour. on ethylene glycol-induced nephrolithiasis in rats. **Indian J Pharmacol**, 37:43-44. 2005.

ALBUQUERQUE, U. P., ANDRADE, L.H.C. Etnobotánica del género *Ocimum* L.(Lamiaceae) en las comunidades afrobrasileñas. **Anales Jard. Bot. Madrid**, 56(1): 107-118. 1998.

BHATTACHARYA, R. K.; ROY, M.; TARAPHDAR, A. K. Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention. **Current Science**, 80:1387-96. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de Março de 2004.

BRASIL. Portaria nº 971 de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial União**, Brasília, DF, 4 maio. 2006^b. seção 1, p.

BRASIL. Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, jun. 2006^a. seção 1, p.

BU WONG, M.; RODRIGUEZ, S. N. M.; PÉREZ, M. D. F.; GUTIÉRREZ, N. D.; RODRÍGUEZ, M. T. B.; PÉREZ, M. D. F. Establecimiento del Kindling por lidocaína en el mono verde. Estudio preliminar de la acción del *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (orégano francés). **Rev Cubana Plant Med**, 2:2:45-47. 1997.

CARRAZONI, E. P. Plantas mediciniais de uso popular. Recife: Ed.Fasa. 2000;

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality, control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Braz J med Biol Res**, 33: 179-189. 2000.

CASTILLO, R. A. M.; GONZÁLEZ, V. P. *Plectranthus amboinicus* (lour.) spreng. **Rev Cubana Plant Med**, 3(3): 110-5. 1999.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quim. Nova**, 21(1). 1998.

CHANDRA, V.; JASTI, J.; KAUR, P.; BETZEL, C. H.; SRINIVASAN, A.; SINGH, T.P. J. First structural evidence of a specific inhibition of phospholipase A2 by alpha-tocopherol (vitamin E) and its implications in inflammation: crystal structure of the complex formed between phospholipase A2 and alpha-tocopherol at 1.8 Å resolution. **Mol Biol**, 5;320215-22. 2002.

CHANG, S. L.; CHANG Y. C.; YANG, C. H.; HONG, H. S. Allergic contact dermatitis to *Plectranthus amboinicus* masquerading as chronic leg ulcer. **Contact Dermatitis.**, 53(6):356-7. 2005.

CEELAND, R.; SQUIES, E. **Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections.** In: Lorian VMD, ed. Antibiotics in Laboratory Medicine. Baltimore: Williams & Wilkins, 739-789. 1991.

COBEA, Comitê Brasileiro de Experimentação Animal 2005. Acessível em: <http://www.cobea.org.br/>. Acessado em Agosto de 2005.

CRONQUIST, A. **An integrate systems of classification of flowering plants.** New York: Columbia University Press. 1981.

COWAN, M. M. Plant Products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, 564–582. 1999.

CUNHA, R.M. **Efeitos do óleo Essencial de *Ocota ducka* Valtimo (Lauraceae) sobre parâmetros cardiovasculares de ratos.** Tese (doutorado)/UFPB. 106p. 2004.

DAGLI, M.L.Z. **Disseminação Linfática do Tumor de Ehrlich: Estudo Experimental.** 1989. 148 p. Dissertação (Mestrado) em Patologia Experimental e Comparada. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1989.

DIHAL, A. A.; WOUTERSEN, R. A.; OMMEN, B. V.; RIETJENS, I. M. C. M.; STIERUM, R. H.. Modulatory effects of quercetin on proliferation and differentiation of the human colotectal cell line Caco-2. **Cancer Letters**, 238:248-259. 2005.

DINIZ, M.F.F.M. *et al.* A. **Memento fitoterápico:** as plantas como alternativa terapêutica; conhecimentos populares e científicos. João Pessoa: Ed Universitária/UFPB, 1997. 205p.

DINIZ, M.F.F.M. **Ensaio toxicológicos pré-clínicos com as folhas de *Cissampelos sympodiales Eichl* (Menisperaceae).** 2000. 147p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Centro de Ciências da Saúde. Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

DONNICI, C. L.; MONTANARI, C. A.; REINA L. C. B.; ANDREI, L.; ALMEIDA, V. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo- celular específico e ciclo celular não específico que interagem com o DNA: Uma introdução. **Quim. Nova**, 28:118-129. 2005.

EUCAST, Definitive Document. **Determination of minimum inhibitory concentrations (MIC's) of antimicrobial agents by ágas dilution.** EUCAST Definitive Document, E. Def 3.1 6:509-515. 2000.

FITOTERÁPICOS, 2005. Acessível em:
http://www.plantamed.com.br/PG/TEXTOS/NCP/Plectranthus_amboinicus.htm. Acessado em Agosto de 2005.

FREITAS, T. A.; RODRIGUES A. C. C. **Etnobotânica das plantas medicinais de Madre de Deus, Bahia. Sitientibus** Série Ciências Biológicas, 6: 133-137. 2006.

HARBONE, J. B. **Phytochemical Methods**. 3ªed., London: Chapman & Hall, 1998.

GURGEL, A. P. A. D.; OLIVEIRA, R. A. G.; PEREIRA, M. R. V.; XAXIER, H. S.; SOUZA, I. A. Screening antimicrobiano e triagem fitoquímica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Plectranthus amboinicus* Lour. Spreng (Lamiaceae). **Brasiliam Journal of pharmacognosy**. 2007. (Em submissão).

HIROSE, M.; AKAGI, K.; HOSHIYA, T.; MIZOGUCHI, Y.; ITO, N.; SHIRAI, T.; Modulating effects of ellagic acid, vanillin and quercetin in a rat médium term multi-organ carcinogenesis model. **Cancer Letters**, 94: 113-121. 1995.

IGLESIAS C. V.; MARANGONI S.; APARÍCIO R.; CAMARGO E. A.; ANTUNES E.; TOYAMA M. H.. Efeito de flavonóides na estrutura e atividade inflamatória da PLA2 de *Crotalus durissus* cascavella. Unicamp 2004.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: www.inca.gov.br. Acessado em Jan 2006.

KARBER, G.; BEHRENS, B. **Estatistical Methods in Biological Assays**. London: Ed. Griffin Ch. and C.1964.

JOMIYAMA, K. & FUNAYAMA, S. Antitumor agents. In: OMURA, S. (edt). **The search for bioactive compounds from microorganisms**, New York: **Spriger-Verlag**, 79-97. 1992.

LUKHOB, C. W.; SIMMONDS, M. S. J.; PATON, A. J.. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. **Journal of Ethnopharmacology**, 103: 1–24. 2005.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA-JÚNIOR, V. F. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, 25:3. 2002.

MALONE, R.A. Pharmacological approach to natural products screening and avaliation. In: *New Natural productys and Plant Drugs with pharmacological Biological or Therapeutical Activity*, ed. By H. Warner and P. Wolf, Springer-Verlag, Berlim, p. 24-53, 1977.

MARKHAN, K.R. **Thecniques of flavonoid Identifi cation**. London:.Academic Press, 1982.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**: Sistema de utilização de plantas medicinais projeto para pequenas comunidades. 4. ed. Fortaleza: EUFC, 2002. 267 p;

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quim. Nova**, 24: 105-111. 2001.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals and antibioticresistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, 31:247-256. 2000.

NATIONAL, Committee for Clinical laboratory Standart. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**. 2^a ed. Tentative Standart. Document M7 – T2, v. 8, n.8, Villa Nova Pa, NCCLS, 1988.

NAPRALERT. **Natural Products Alert**. Program for Collaborative Research in the Pharmacological Sciences (PCRPS), A world Health Organization Collaborating Centre for Traditional Medicines. College of Pharmacy, University of Illinois, Chicago, EUA. 2003.

NEU, R. A New reagent for differentiating and determining flavones of paper chromatograms. **Naturwissenschaften**, 43: 82. 1956.

NIJVELDT, R. J.; NOOD E.; HOORN D. E.C.; BOELENS P. G.; NORREN K.; LEEUWEN P.A.M.. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am J Clin Nutr**, 74:418–25. 2006.

NOGUEIRA, J. C. R. **Atividade antimicrobiana *in vitro* de produtos vegetais sobre microrganismos isolados de pacientes portadores de otite externa aguda**. João Pessoa, 180p. 2004. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Produtos Sintéticos e Bioativos. Universidade Federal da Paraíba;

OLIVEIRA, J. E. Z.; AMARAL, C. L. F.; CASALI, V. W. D.. Recursos genéticos e perspectivas do melhoramento de plantas medicinais. **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**. 2000;

OLIVEIRA, R. A. G. **Plantas medicinais usadas tradicionalmente na Dermatologia: Avaliação da atividade biológica dos seus extratos, óleos essenciais e suas associações.** João Pessoa, 180 p. 2006.

Tese de Doutorado do Programa de Pós Graduação em produtos sintéticos e bioativos. Universidade Federal da Paraíba;

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDINANS, I. G.; BUELA, I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Rev Cubana Plant Méd**, 8: 395-400. 2001.

PARRA, V.; RUIZ, R. A. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Orégano Francês). Estúdio toxicogenético de um extracto fluido y del aceite esencial. Ver. **Cubana de Plant. Méd, Mayoago**, 4: 68-73. 1999.

PEYRET, M.; CARRET, G.; CARRE, C.; FARDEL, G.; FLANDROIS J. P. Etude mathematique de la curve de mortalite d' *Escherichia coli* expose aux polymixines. **Pathologie Biologie**, 38:441-445. 1990.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFÂNIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**, 25: 45-61. 2002.

PRINCIPIOS ÉTICOS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, 2005. Acessível em:

http://www.unb.br/ib/principios_eticos.htm. Acessado em Agosto de 2005.

RODRÍGUEZ, M. T. B.; PÉREZ, M. D. F.; VILLATE, M. L.; ALONSO, N. L.; GONZÁLEZ, M. E. A.; PÉREZ-SAAD, H.. Perfil Neurofarmacológico del *Plectranthus amboinicus* (orégano francés). Potenciación de las estereotipias inducidas por anfetamina. **Rev. Cubana Plant. Med**, 1: 15-17. 1999.

SÁLMAN, J. G. D.; JIMENEZ, T. E. G.; CASTILHO, R. M.. Efecto antioxidante de los extractos fluido e de flavanóides del *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (Orégano Francés). **Rev. Cubana de Plant. Med**, 1: 27-30. 1996.

SANTOS, C.S.; COSTA, F.W.; SANTOS, R. L.; FERRI, H. P.; DERREIRA, D. H.; SERAPHIN, C. J. Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 16: 552-556. 2006.

SHARMA, O. P.; DAWRA, R. K. Thin-layerchromagraphyc separations of lantadens, the pentacyclic triterpenoids from (Lantana câmara) plant. **J. Chrom.**, 587: 351-354. 1991.

SIEGRIST, B. E. Efficacy of supervised rinsing with chlorhexidine digluconate in comparison to phenolic and plant alkaloid compounds. **J. Periodont. Res**, 21: 66-73. 1986.

SILVA, K. L.; CECHINEL FILHO, V. Plants of the genus Bauhinia: chemical composition and pharmacological potential. **Quím. Nova**, 25: 449-454. 2002.

SILVA M. G; OLIVEIRA F. S; QUITANS - JÚNIOR L. J; OLIVEIRA T. M. L; DINIZ M. F. F. M. Investigaçãõ do Efeito Analgésico Central e Antiinflamatório de *Conocliniopsis prasiifolia* (DC) R.M. King & H. Robinson em Roedores. **Acta Farm. Bonaerense**, 24: 533-7. 2005.

SINGH, G.; SINGH, O. P.; PRASAD, Y. R.; LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. Studies on essential oils, Part 33: chemical and insecticidal investigations on leaf oil of *Coleus amboinicus* Lour. **Flavour Fragr. J.** 17: 440–44. 2002.

SINGLETERY, K. Diet, natural products and cancer chemoprevention. **The J of Nutrition**, 465-6. 2000.

STOCK, C. C.; SUGIURA, K. The Effect of Phosphoramides on the Growth of a Variety of Mouse and Rats Tumors. **Cancer Research**, 2: 38-50. 1954.

STOCK, C.C.; CLARCK, D.A.; PHILIPS, F.S. Sarcoma 180 – inhibitor screening date. **Cancer Research**, 2: 2-3. 1955.

TAKASHI, K.; YUKO, A.; YOICHI, A.; SHIMERU, K.; SHIGERU, K.; NOBUHIRO, I.; MIKIRO, N.; HITOSHI, S.; SHUN, H. In vitro activity of lauric acid or myristilamine in combination with six antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Int J Antimicrob Agents**, 27:51-57. 2005.

THOMPSON D. P. Inhibition of growth of mycotoxigenic *Fusarium* species by butylated hydroxyanisole and or carvacrol. **Journal of Food Protection**, 59: 412-415. 1996.

UAWONGGUL, N.; CHAVEERACH, A.; THAMMASIRIRAK, S.; ARKARAVICHEN, T.; CHUACHAN, C.; DADUANG, S. Screening of plants acting against *Heterometrus laoticus* scorpion venom activity on fibroblast cell lysis. **J Ethnopharmacol.**, 103:201-7. 2006.

ULTREE, A.; GORRIS, L. G. M.; SMID, E. J. Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Journal of Applied Microbiology**, 85: 211-218. 1998.

WAGNER, H; BLADT, S. **Plant drug analysis** – A thin layer chromatography atlas. Munich: Springer. 2^aed. 1996.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M.. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, 28:3. 2005.

VILLATE, M. L.; PÉREZ-SAAD, H.; PÉREZ, M. D. F.; SARRÍA, E. G. CASTILHO R. M.; RODRÍGUEZ M. T. B. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (orégano francés): efecto antimuscarínico y potenciación de la adrenalina. **Rev Cubana Plant Med.**, 4:29-32. 1999.

WANG, H.; QIAL, Z.; REN, W. Flavonoids: Promising anticancer agents. **Med res rev**, 23: 519-534. 2003.

WINTER, C. A.; RISHLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenan induced edema en hind paw as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 3: 544-547. 1962.