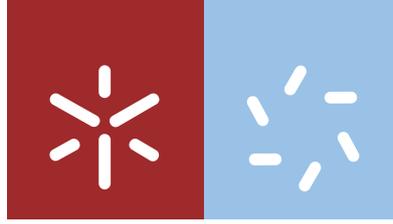




Universidade do Minho
Escola de Ciências

Rejaine Martins Rios

**Avaliação do potencial bioativo
de plantas medicinais do gênero
Hyptis oriundas do cerrado brasileiro**



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Rejaine Martins Rios

**Avaliação do potencial bioativo
de plantas medicinais do gênero
Hyptis oriundas do cerrado brasileiro**

Tese de Doutorado
Doutorado em Ciências
Área de Conhecimento em Biologia

Trabalho efetuado sob a orientação do
Professor Doutor Alberto Carlos Pires Dias
e do
Professor Doutor Fabiano Silva Guimarães

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição-NãoComercial-Compartilhalgal
CC BY-NC-SA

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

AGRADECIMENTOS

A Deus, agradeço minha vida, minha família, amigos, oportunidades e conquistas.

A meus amados pais e aos meus tão queridos irmãos, que sempre me apoiam incondicionalmente e são o esteio de minhas conquistas.

Ao meu amor, Marcos, melhor amigo, parceiro e cúmplice, sempre junto de mim, me apoiando, me incentivando e me orientando com todo seu amor e paciência.

Ao meu orientador, Professor Alberto, pela oportunidade, por todos os ensinamentos, pelos conselhos, pelos vinhos, pela pitinga no “*Between*” e pela orientação no desenvolvimento do trabalho.

Ao meu orientador Fabiano, pelo voto de confiança, pelo exemplo notório de professor e pesquisador, que juntamente com sua equipe do LCTV, me repassou conhecimentos valiosos sobre cultura de tecidos vegetais.

A Bárbara e Viviane, minhas amigas irmãs, com as quais vivencio uma história verdadeira de companheirismo, cumplicidade e amizade que se iniciou em Terras Portuguesas.

A Sofia, Angélica, Weina, Ana Garcia, Richard, Henrique, Arthur, Vera, Luis, Bianca e Rupesh que tão gentilmente me receberam no LBV da Uminho, por todo apoio e terna convivência.

A Paula, Luciana, Ana Cláudia, Elisvane, Mariluz, Juliana, Núbia, Rita e Aurélio pelo grande auxílio no LCTV e pela forma gentil, otimista e carinhosa com que me receberam.

A todos os servidores da escola de Ciências da Uminho pela possibilidade de realização deste Doutorado, em especial, Rui Pedro, Rui Tavares, Maria Teresa, Alberto, Ana Cunha, Hernâni, Luís Miguel, Cristina, Amaro, Manuela, Maria Isabel, Lídia, Nuria e Paula Rocha e aos amigos do Mestrado 3BP com os quais compartilhei muitos momentos de alegria e de preocupações.

Ao IFGoiano pela disponibilidade de realização deste trabalho e, em especial aos professores Fabiano, Mariana, Sebastião e Paulo pela disponibilização dos laboratórios, materiais e apoio para realização dos experimentos.

À UFJF, em especial, as professoras Maria Silvana, Elita e Renata Mendes pela simpatia, competência e colaboração.

Aos meus amigos(as) e familiares pelas orações e pela amizade verdadeira. E a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, aqui fica meu agradecimento.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho acadêmico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração. Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOATIVO DE PLANTAS MEDICINAIS DO GÊNERO *Hyptis* ORIUNDAS DO CERRADO BRASILEIRO.

RESUMO

Plantas do gênero *Hyptis* distribuídas por regiões tropicais e subtropicais apresentam grande utilização na medicina tradicional para tratamento de distúrbios gastrointestinais, infecções na pele, úlceras, inflamação, dores, câncer, problemas respiratórios, gripe, câibras, malária, secreções nos brônquios, febre e infecções por microrganismos. Mesmo com toda a demanda para fins medicinais, faltam estudos que comprovem cientificamente seus benefícios à saúde humana.

O objetivo desta Tese foi avaliar a atividade antimicrobiana, antioxidante, citotóxica, citoprotetora e anti-inflamatória *in vitro* de extratos de folhas de *Hyptis marrubioides* (Hm), *Hyptis pectinata* (Hp) e *Hyptis suaveolens* (Hs) oriundas do cerrado brasileiro, bem como determinar seu perfil fitoquímico. Além disso, culturas de células em suspensão (CCS) destas espécies foram estabelecidas, eliciadas com estressores bióticos e abióticos e avaliadas quanto à produção de ácido rosmarínico (AR).

A presença de ácidos fenólicos nos extratos foi confirmada por HPLC-DAD, bem como a presença de flavonóis e flavonas. CCS de Hs eliciadas com MeJ e de Hm eliciadas com MeJ e AS demonstraram um significativo aumento de AR quando comparadas ao controle. Nos ensaios antioxidantes os extratos atingiram EC₅₀ a diferentes concentrações e, portanto, apresentaram potencial antioxidante para as diferentes metodologias utilizadas. Nos ensaios antimicrobianos, verificou-se atividade antibiótica frente as cepas *S. aureus* (ATCC® 25923™), *S. aureus* (ATCC® 29213™), *E. coli* (ATCC® 10536™), *S. Cholerasuis* (ATCC® 10708™), *P. aeruginosa* (ATCC® 9027™) e *P. aeruginosa* (ATCC® 27853™) o que corrobora a utilização destas plantas na medicina tradicional. Os extratos também, indicaram efeitos não citotóxicos e ação antioxidante ao protegerem as células HepG2 de danos induzidos por insultos oxidativos, em condições de co-tratamento e pré-tratamento. Constatou-se que os extratos à concentração de 100µg/ml atuaram no controle da produção de EROs induzidos por t-BHP garantindo o efeito citoprotetor. Os extratos de Hp e Hs promoveram a inibição da produção de NO em células BV2 sem prejuízo da viabilidade demonstrando uma possível ação anti-inflamatória.

As informações contidas neste trabalho proporcionam auxílio para futuros estudos que busquem compreender a relação entre os metabólitos secundários presentes nos extratos e os mecanismos implícitos a suas potencialidades antioxidante, anti-inflamatória e citoprotetora.

Palavras chave: BV2, citoproteção, concentração inibitória mínima, cultura *in vitro*, ensaio antioxidante, HePG2

EVALUATION OF THE BIOACTIVE POTENTIAL OF MEDICINAL PLANTS OF THE GENUS *Hyptis* NATIVES OF THE BRAZILIAN CERRADO.

ABSTRACT

Hyptis plants distributed in tropical and subtropical regions are widely used in traditional medicine to treat gastrointestinal disorders, skin infections, ulcers, inflammation, pain, cancer, respiratory problems, influenza, cramps, malaria, bronchial secretions, fever and infections by microorganisms. Even with all the demand for medicinal purposes, studies that scientifically prove its benefits to human health are lacking.

The aim of this thesis was to evaluate the *in vitro* antimicrobial, antioxidant, cytotoxic, cytoprotective and anti-inflammatory activity of extracts of *Hyptis marrubioides* (Hm), *Hyptis pectinata* (Hp) and *Hyptis suaveolens* (Hs) from the Brazilian Cerrado as well as to determine your phytochemical profile. In addition, suspension cell cultures (SCC) of these species were established, elicited with biotic and abiotic stressors and evaluated for rosmarinic acid (AR) production.

The presence of phenolic acids in extracts was confirmed by HPLC-DAD, as well as the presence of flavonols and flavones. SCC of Hs elicited with MeJ and of the Hm elicited with MeJ and AS showed a significant increase in AR when compared to the control. In the antioxidant assays the extracts reached EC₅₀ at different concentrations and, therefore, presented antioxidant potential for the different methodologies used. In the antimicrobial assays, antibiotic activity was verified against *S. aureus* (ATCC® 25923TM), *S. aureus* (ATCC® 29213TM), *E. coli* (ATCC® 10536TM) strains, *S. Cholerasuis* (ATCC® 10708TM), *P. aeruginosa* (ATCC® 9027TM) and *P. aeruginosa* (ATCC® 27853TM) which corroborates the use of these plants in traditional medicine. The extracts also indicated non-cytotoxic effects and antioxidant action while protecting HepG₂ cells from damage induced by oxidative insults under co-treatment and pretreatment conditions. It was found that extracts at 100µg / ml concentration controlled the production of t-BHP-induced ROS guaranteeing the cytoprotective effect. The extracts of Hp and Hs promoted the inhibition of NO production in BV2 cells without impairing viability showing a possible anti-inflammatory action.

The information contained in this work provides help for future studies that seek to understand the relationship between the secondary metabolites present in the extracts and the mechanisms implicit to their antioxidant, anti-inflammatory and cytoprotective potentialities.

Key words: antioxidant assay, BV2, cytoprotection, *in vitro* culture, minimal inhibitory concentration, HePG₂,

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
ABREVIACÕES, SÍMBOLOS E SIGLAS.....	xvii
CAPÍTULO 1 – Introdução geral.....	1
1.1 Biodiversidade: a matéria-prima da bioprospecção brasileira.....	2
1.2 Plantas medicinais e metabólitos secundários.....	4
1.2.1 Compostos fenólicos.....	5
1.2.1.1 Flavonoides.....	6
1.2.1.2 Ácidos fenólicos.....	10
1.3 Família <i>Lamiaceae</i> : gênero <i>Hyptis</i>	11
1.3.1 Espécie <i>Hyptis marrubioides</i> Epling.....	12
1.3.2 Espécie <i>Hyptis pectinata</i> Poit.	14
1.3.3 Espécie <i>Hyptis suaveolens</i> Poit.	16
1.4 Radicais livres, stress oxidativo e antioxidantes.....	20
1.5 Objetivos gerais e sinopse da Tese.....	23
CAPÍTULO 2 – Composição química, atividades farmacológicas, toxicidade e uso alimentar de <i>Hyptis</i> spp.: revisão sistemática.....	25
2.1 Introdução.....	26
2.2 Materiais e métodos.....	29
2.3 Resultados e Discussão.....	29
2.3.1 Busca na literatura.....	30
2.3.1.1 Composição química.....	31
2.3.1.1.1 Principais fitoconstituintes dos extratos vegetais.....	31
2.3.1.1.2 Principais fitoconstituintes dos óleos essenciais.....	32
2.3.1.2 Atividades farmacológicas.....	41
2.3.1.2.1 Atividade antimicrobiana.....	43
2.3.1.2.1.1 Extratos vegetais.....	44
2.3.1.2.1.2 Óleo essencial	44
2.3.1.2.2 Atividade antioxidante	45
2.3.1.2.3 Atividade antinoceptiva, anticonvulsivante e sedativa.....	46
2.3.1.2.4 Atividade citotóxica, genotóxica e antiproliferativa.....	47
2.3.1.2.5 Atividade de regeneração hepática, gastroprotetora, hepatoprotetora, citoprotetora e neuroprotetora, cicatrizante e antiulcerogênica.....	48
2.3.1.2.6 Atividade inseticida, repelente e acaricida.....	49
2.3.1.2.7 Atividade anti-inflamatória, antiedematogênica e vasorelaxante.....	50
2.3.1.2.8 Atividade antidiabética, antidepressora, moluscicida, espamolítica e hipotensão associada à taquicardia.....	51
2.3.1.3 Toxicidade.....	52
2.3.1.4 Utilização como alimento.....	53
2.4 Conclusão.....	83

CAPÍTULO 3 – Avaliação do cultivo <i>in vitro</i> de <i>Hyptis</i> spp. na produção de metabólitos secundários.....	84
3.1 Introdução.....	85
3.2 Materiais e Métodos.....	87
3.2.1 Obtenção do material vegetal.....	87
3.2.2 Estabelecimento e multiplicação <i>in vitro</i>	87
3.2.3 Indução de calos.....	88
3.2.4 Cultura de suspensão celular.....	89
3.2.5 Determinação da curva de crescimento da suspensão celular.....	89
3.2.5.1 Quantificação de açúcares do meio de cultura das suspensões.....	89
3.2.5.2 Determinação dos compostos fenólicos da biomassa celular.....	90
3.2.5.3 Teste de viabilidade celular.....	90
3.2.6 Eliciação das culturas.....	91
3.2.7 Caracterização fitoquímica das culturas de células de <i>Hyptis</i> spp. por HPLC-DAD.....	92
3.2.8 Caracterização fitoquímica de calos e células por espectrometria de massa.....	92
3.3 Análise estatística.....	93
3.4 Resultados e discussão.....	93
3.4.1 Indução de calos e cultura de suspensão celular	93
3.4.2 Determinação da curva de crescimento das culturas de suspensão celular, variação do pH e viabilidade celular e quantificação de açúcares.....	95
3.4.3 Eliciação das culturas de suspensão celular e análise em HPLC-DAD.....	98
3.4.4 Espectrometria de massa de calos e células	106
3.5. Conclusão.....	109
CAPÍTULO 4 – Atividade antioxidante de extratos metanólicos de <i>Hyptis</i> spp.....	110
4.1 Introdução.....	111
4.1.1 Determinação do potencial antioxidante dos extratos de <i>Hyptis</i> “ <i>in vivo</i> ” e “ <i>in vitro</i> ”.....	111
4.2 Materiais e métodos.....	113
4.2.1 Coleta e processamento do material vegetal.....	113
4.2.1.1 Biomassa <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	113
4.2.2 Preparação de extratos metanólicos de <i>Hyptis</i> spp.....	114
4.2.3 Caracterização fitoquímica dos extratos metanólicos por HPLC-DAD e espectrometria de massa	114
4.2.4 Ensaio antioxidantes de <i>Hyptis</i> spp.....	115
4.2.4.1 Ensaio DPPH.....	115
4.2.4.2 Ensaio da capacidade de quelação do ferro.....	116
4.2.4.3 Ensaio da capacidade de inibição da produção de óxido nítrico.....	116
4.2.4.4 Ensaio da capacidade de sequestro do ânion superóxido.....	117
4.2.4.5 Ensaio da inibição da oxidação do β etacaroteno/ácido linoleico.....	118
4.2.4.6 Ensaio FRAP.....	119
4.3 Análise estatística.....	120
4.4 Resultados e discussão.....	120
4.4.1 Análise em HPLC-DAD e HPLC-DAD-Ms.....	120
4.4.2 Ensaio DPPH.....	127
4.4.3 Ensaio da capacidade de quelação do ferro.....	130
4.4.4 Ensaio da capacidade de inibição da produção de óxido nítrico.....	136

4.4.5 Ensaio da capacidade de sequestro do ânion superóxido.....	136
4.4.6 Ensaio de oxidação do β -caroteno/ácido linoleico.....	140
4.4.7 Ensaio FRAP.....	143
4.5 Conclusão.....	146
CAPÍTULO 5 – Atividade antibacteriana dos extratos de <i>Hyptis</i> spp.....	147
5.1 Introdução.....	148
5.2 Materiais e métodos.....	150
5.2.1 Obtenção e identificação do material vegetal.....	150
5.2.2 Preparação dos extratos metanólicos, acetato de etila e diclorometano de <i>Hyptis</i> spp.....	151
5.2.3 Microrganismos.....	151
5.2.4 Avaliação da atividade antibacteriana e preparação dos inóculos.....	151
5.2.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	152
5.2.6 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático.....	155
5.3 Resultados.....	155
5.3.1 Rendimento dos extratos metanólicos de <i>Hyptis</i> spp.....	155
5.3.2 Atividade antibacteriana de <i>Hyptis</i> spp.	156
5.4 Conclusão.....	160
CAPÍTULO 6 – Atividade citoprotetora e anti-inflamatória de extratos de <i>Hyptis</i> spp.....	161
6.1 Introdução.....	162
6.2 Materiais e métodos.....	165
6.2.1 Obtenção do material vegetal e preparação dos extratos metanólicos.....	165
6.2.2 Cultura de células HepG ₂ e BV2.....	165
6.2.3 Análise de viabilidade.....	166
6.2.3.1 Ensaio de MTT para determinação da viabilidade celular.....	166
6.2.3.2 Ensaio de citotoxicidade em células HepG ₂	166
6.2.3.3 Ensaios de proteção contra o estresse oxidativo induzido por agentes oxidantes em células HepG ₂	167
6.2.3.3.1 Co-tratamento de células HepG ₂ com extrato e t-BHP.....	167
6.2.3.3.2 Co-tratamento de células HepG ₂ com extrato e paraquat.....	167
6.2.3.3.3 Pré-tratamento de células HepG ₂ com extrato e posterior adição de t-BHP.....	168
6.2.3.3.4 Pré-tratamento de células HepG ₂ com extrato e posterior adição de paraquat.....	168
6.2.3.4 Ensaio para determinação de EROs intracelular.....	168
6.2.3.5 Ensaio para determinação da atividade anti-inflamatória pela produção de óxido nítrico (NO).....	169
6.3 Análise estatística.....	169
6.4 Resultados e discussão.....	170
6.4.1 Ensaios de citotoxicidade em células HepG ₂	170
6.4.2 Ensaios de proteção contra o estresse oxidativo induzido por agentes oxidantes em células HepG ₂	173
6.4.3 Ensaio para determinação de EROs intracelular.....	177
6.4.4 Ensaio para determinação da atividade anti-inflamatória pela produção de óxido nítrico (NO)	179

6.5 Conclusão	182
CAPÍTULO 7 – Conclusões finais.....	182
CAPÍTULO 8 – Referências bibliográficas.....	187

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – Introdução geral

Tabela 1.1 Compostos majoritários encontrados em óleos essenciais de <i>Hyptis suaveolens</i> ...	19
Tabela 1.2 Diferentes tipos de EROs e ERNs produzidos nas células.....	21
Tabela 1.3 Classificação dos antioxidantes.....	22

CAPÍTULO 2 – Composição química, atividades farmacológicas, toxicidade e uso alimentar de *Hyptis* spp.: revisão sistemática

Tabela 2.1 Uso etnobotânico de plantas do gênero <i>Hyptis</i>	28
Tabela 2.2 Fitoconstituintes de extratos de plantas do gênero <i>Hyptis</i>	32
Tabela 2.3 Fitoconstituintes químicos majoritários identificados em óleos essenciais de plantas do gênero <i>Hyptis</i>	34
Tabela 2.4 Principais atividades biológicas do gênero <i>Hyptis</i>	42
Tabela 2.5 Atividade antimicrobiana de biomassa seca, extratos e compostos isolados de plantas do gênero <i>Hyptis</i>	55
Tabela 2.6 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de plantas do gênero <i>Hyptis</i>	58
Tabela 2.7 Atividade antioxidante de fitoconstituintes de plantas do gênero <i>Hyptis</i>	63
Tabela 2.8 Atividade antinociceptiva, sedativa e anticonvulsivante de fitoconstituintes de plantas do gênero <i>Hyptis</i>	65
Tabela 2.9 Atividade citotóxica, genotóxica, antiproliferativa de fitoconstituintes de plantas do gênero <i>Hyptis</i>	68
Tabela 2.10 Atividade gastroprotetora, hepatoprotetora, citoprotetora, neuroprotetora, cicatrizante de fitoconstituintes de plantas do gênero <i>Hyptis</i>	70
Tabela 2.11 Atividade inseticida, repelente e acaricida de fitoconstituintes de plantas do gênero <i>Hyptis</i>	73
Tabela 2.12 Atividade anti-inflamatória, antiedematogênica e vasorelaxante de fitoconstituintes de plantas do gênero <i>Hyptis</i>	79
Tabela 2.13 Atividade antidiabética, antidepressiva, moluscicida, espasmolítica e hipotensão associada à taquicardia de fitoconstituintes de plantas do gênero <i>Hyptis</i>	81
Tabela 2.14 Testes toxicológicos realizados em plantas do gênero <i>Hyptis</i>	82

CAPÍTULO 3 – Avaliação do cultivo *in vitro* de *Hyptis* spp. na produção de metabólitos secundários

Tabela 3.1 Gradiente de fase móvel utilizada no sistema cromatográfico para a determinação dos compostos fenólicos.	92
Tabela 3.2 Porcentagem de calos formados a partir de explantes de <i>Hyptis</i> spp. cultivados em meio MS suplementados com diferentes concentrações de auxinas/citocininas.....	95
Tabela 3.3 Valores do ph e percentual de viabilidade celular durante um ciclo de crescimento de culturas de células.	96
Tabela 3.4 Dados obtidos por HPLC-MS do AR identificado na biomassa de calos e células (liofilizadas e resuspensas em metanol 80%). (Tr) tempo de retenção.	109

CAPÍTULO 4 – Atividade antioxidante dos extratos metanólicos de *Hyptis* spp.

Tabela 4.1 Dados obtidos por HPLC-DAD do fitoconstituintes presentes em extratos metanólicos de folhas de Hm <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	123
--	-----

Tabela 4.2 Dados obtidos por HPLC-DAD do fitoconstituintes presentes em extratos metanólicos de folhas de Hp <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	123
Tabela 4.3 Dados obtidos por HPLC-DAD do fitoconstituintes presentes em extratos metanólicos de folhas de Hs <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	123
Tabela 4.4 Dados de MS obtidos por HPLC-DAD-MS do AR identificado nos extratos metanólicos das folhas de Hm, Hp e Hs <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . (Tr) tempo de retenção.....	124
Tabela 4.5 Valores EC ₅₀ dos extratos metanólicos de <i>Hyptis</i> no ensaio DPPH.....	129
Tabela 4.6 Valores EC ₅₀ dos extratos metanólicos de <i>Hyptis</i> no ensaio quelação do ferro.....	132
Tabela 4.7 Resultados da análise de Quelação do Óxido Nítrico.	135
Tabela 4.8 Resultados da análise do sequestro do radical superóxido.	139
Tabela 4.9 Resultados da análise do Inibição betacaroteno.....	142
Tabela 4.10 Valores EC ₅₀ dos extratos metanólicos de <i>Hyptis</i> no ensaio FRAP.	145
CAPÍTULO 5 – Atividade antibacteriana dos extratos de <i>Hyptis</i> spp.	
Tabela 5.1 – Cepas Gram positivas e Gram negativas de referência da <i>American Type Culture Collection</i> utilizadas nos testes antimicrobianos com extratos de Hm, Hp e Hs.....	151
Tabela 5.2 - Valores do peso (g) e dos rendimentos (%) dos extratos metanólicos, de acetato de etila e de diclorometano obtidos de folhas de Hm, Hp e Hs.	156
Tabela 5.3 Lista de patógenos prioritários publicada pela organização mundial da saúde em 2017 para guiar a pesquisa, a descoberta e o desenvolvimento de novos antibióticos.....	156
Tabela 5.4 Concentração inibitória mínima (CIM), efeitos bacteriostáticos e concentração bactericida mínima (CBM) de extratos metanólicos, de acetato de etila e diclorometano de Hm, Hp e Hs.	159

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – Introdução geral

Figura 1.1 Visão geral das principais vias biossintéticas dos metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário nas plantas.....	5
Figura 1.2 Grupo fenol.....	5
Figura 1.3 Classificação dos compostos fenólicos.....	7
Figura 1.4 Classificação dos flavonóides.....	8
Figura 1.5 Duas importantes classes dos ácidos fenólicos.....	10
Figura 1.6 Arbusto de <i>Hyptis marruboides</i> Epling adulto <i>in situ</i> (A e B), Planta em floração (C e F), Vista adaxial da folha (D), Detalhe das nervuras, indumento e margem da folha (E).....	13
Figura 1.7 Distribuição geográfica de <i>Hyptis marruboides</i> no Brasil.....	14
Figura 1.8 Arbusto de <i>Hyptis pectinata</i> Poit. adulto (A e B), Desenho representativo do ramo florido, do cálice e da flor isolada.....	15
Figura 1.9 Distribuição geográfica de <i>Hyptis pectinata</i> no Brasil.	16
Figura 1.10 Arbusto de <i>Hyptis suaveolens</i> Poit. adulto <i>in situ</i> (A e B), desenho representativo do ramo florido, do cálice e da flor isolada (C), Planta em floração (D)	17
Figura 1.11 Distribuição geográfica de <i>Hyptis suaveolens</i> no Brasil.	18

CAPÍTULO 2 – Composição química, atividades farmacológicas, toxicidade e uso alimentar de *Hyptis* spp.: revisão sistemática

Figura 2.1 Diagrama de fluxo de identificação do estudo com inclusões e exclusões.....	30
--	----

CAPÍTULO 3 – Avaliação do cultivo *in vitro* de *Hyptis* spp. na produção de metabólitos secundários

Figura 3.1 Exsiccatas de <i>Hyptis marruboides</i> , <i>Hyptis pectinata</i> e <i>Hyptis suaveolens</i> , respectivamente.....	87
Figura 3.2 Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de <i>Hyptis</i> spp.....	94
Figura 3.3 Indução de calos por meio de folhas e segmentos caulinares de <i>Hyptis</i> spp.....	94
Figura 3.4 Fases da curva de crescimento das culturas de suspensão celular de <i>Hyptis</i> spp em Meio Ms sem ágar, suplementado com BAP/ANA (4,4 μ M e 13,4 μ M).....	97
Figura 3.5 Variação nas taxas de consumo de sacarose e seus componentes monossacarídeos, glucose e frutose em culturas de suspensão celular de <i>Hyptis</i> spp.....	97
Figura 3.6 Espectro do composto AR usado para identificação nas culturas de células em suspensão eliciadas com MeJ, AS e EL obtido por HPLC-DAD a 350nm.....	100
Figura 3.7 Quantificação por HPLC-DAD de ácido rosmarínico em culturas de células em suspensão de <i>Hyptis</i> spp. em μ g/g após eliciação.	101
Figura 3.8 Porcentagem de viabilidade celular em culturas de células em suspensão de <i>Hyptis</i> spp. antes e após eliciação via método azul de tripan.	102
Figura 3.9 Fotos dos tratamentos de eliciação realizados com as plantas Hm e Hs.....	103
Figura 3.10 Cromatograma e espectro de massas da solução padrão AR utilizada na análise por HPLC/Ms	107
Figura 3.11 Cromatograma e espectro de massa obtido para o composto AR na biomassa de calos de Hm utilizados em análise por HPLC/Ms.	107
Figura 3.12 Cromatograma e espectro de massa obtido para o composto AR na biomassa de calos de Hp utilizados em análise por HPLC/Ms.	107

Figura 3.13 Cromatograma e espectro de massa obtido para o composto AR na biomassa de calos de Hs utilizados em análise por HPLC/Ms.	108
Figura 3.14 Cromatograma e espectro de massa obtido para o composto AR na biomassa de células em suspensão de Hm utilizados em análise por HPLC/Ms.	108
Figura 3.15 Cromatograma e espectro de massa obtido para o composto AR na biomassa de células em suspensão de Hp utilizados em análise por HPLC/Ms.	108
Figura 3.16 Cromatograma e espectro de massa obtido para o composto AR na biomassa de células em suspensão de Hs utilizados em análise por HPLC/Ms.	109
 CAPÍTULO 4 – Atividade antioxidante dos extratos metanólicos de <i>Hyptis</i> spp.	
Figura 4. Cromatograma dos extratos etanólicos de folhas de <i>H. marrubioides</i> (a), <i>H. pectinata</i> (c) e <i>H. suaveolens</i> (e) a concentração de 100 µg/ml “ <i>in vivo</i> ” e <i>H. marrubioides</i> (b), <i>H. pectinata</i> (d) e <i>H. suaveolens</i> (f) a concentração de 40 µg/ml “ <i>in vitro</i> ” obtidos por HPLC-DAD a 350nm.....	121
Figura 4.2 Espectros visíveis dos compostos fenólicos padrões obtidos por HPLC-DAD a 350nm.	122
Figura 4.3 – Cromatogramas e espectros de massas de extratos metanólicos das folhas de Hm (1), Hp (2) e Hs (3) <i>in vivo</i> utilizados em análise por HPLC/Ms.....	125
Figura 4.4 – Cromatogramas e espectros de massas de extratos metanólicos das folhas de Hm (1), Hp (2) e Hs (3) <i>in vitro</i> utilizados em análise por HPLC/Ms	126
Figura 4.5 Microplaca demonstrativa do ensaio DPPH ao final de 60 minutos.....	127
Figura 4.6 Redução de radicais DPPH pela ação antioxidante da quercetina e dos extratos metanólicos de plantas “ <i>in vivo</i> ” de <i>Hyptis marrubioides</i> (ExMtHmVv), <i>Hyptis pectinata</i> (ExMtHpVv) e <i>Hyptis suaveolens</i> (ExMtHsVv) e “ <i>in vitro</i> ” de <i>Hyptis marrubioides</i> (ExMtHmVt), <i>Hyptis pectinata</i> (ExMtHpVt) e <i>Hyptis suaveolens</i> (ExMtHsVt).	128
Figura 4.7 EC ₅₀ do padrão quercetina e dos extratos metanólicos de plantas “ <i>in vivo</i> ” de <i>Hyptis marrubioides</i> (ExMtHmVv), <i>Hyptis pectinata</i> (ExMtHpVv) e <i>Hyptis suaveolens</i> (ExMtHsVv) e “ <i>in vitro</i> ” de <i>Hyptis marrubioides</i> (ExMtHmVt), <i>Hyptis pectinata</i> (ExMtHpVt) e <i>Hyptis suaveolens</i> (ExMtHsVt).	128
Figura 4.8 Microplaca demonstrativa do ensaio da capacidade de quelação do ferro.....	131
Figura 4.9 Atividade de quelação do íon ferro pela ação quelante da quercetina e dos extratos metanólicos de plantas “ <i>in vivo</i> ” de <i>Hyptis marrubioides</i> (ExMtHmVv), <i>Hyptis pectinata</i> (ExMtHpVv) e <i>Hyptis suaveolens</i> (ExMtHsVv) e “ <i>in vitro</i> ” de <i>Hyptis marrubioides</i> (ExMtHmVt), <i>Hyptis pectinata</i> (ExMtHpVt) e <i>Hyptis suaveolens</i> (ExMtHsVt). Os valores são provenientes de três experimentos triplicados independentes e representados com média ± E.P.M.....	131
Figura 4.10 EC ₅₀ do padrão quercetina e dos extratos metanólicos de plantas “ <i>in vivo</i> ” de <i>Hyptis marrubioides</i> (ExMtHmVv), <i>H. pectinata</i> (ExMtHpVv) e <i>H. suaveolens</i> (ExMtHsVv) e “ <i>in vitro</i> ” de <i>H. marrubioides</i> (ExMtHmVt), <i>H. pectinata</i> (ExMtHpVt) e <i>H. suaveolens</i> (ExMtHsVt).....	132
Figura 4.11 Microplaca demonstrativa do ensaio de inibição da formação de óxido nítrico	134
Figura 4.12 Redução da produção de óxido nítrico pela quercetina e pelos extratos metanólicos de plantas “ <i>in vivo</i> ” de <i>Hyptis marrubioides</i> (ExMtHmVv), <i>Hyptis pectinata</i> (ExMtHpVv) e <i>Hyptis suaveolens</i> (ExMtHsVv) e “ <i>in vitro</i> ” de <i>Hyptis marrubioides</i> (ExMtHmVt), <i>Hyptis pectinata</i> (ExMtHpVt) e <i>Hyptis suaveolens</i> (ExMtHsVt).	134
Figura 4.13 EC ₅₀ do padrão quercetina e dos extratos metanólicos de plantas “ <i>in vivo</i> ” de <i>Hyptis marrubioides</i> (ExMtHmVv) e <i>Hyptis pectinata</i> (ExMtHpVv) e “ <i>in vitro</i> ” de <i>Hyptis marrubioides</i> (ExMtHmVt), <i>Hyptis pectinata</i> (ExMtHpVt).....	135
Figura 4.14 Microplaca demonstrativa do ensaio de avaliação do sequestro de superóxido.....	137

Figura 4.15 – Inibição da produção de azul de nitrotetrazólio pela quercetina e pelos extratos metanólicos de plantas “ <i>in vivo</i> ” de <i>Hyptis marruboides</i> (ExMtHmVv), <i>Hyptis pectinata</i> (ExMtHpVv) e <i>Hyptis suaveolens</i> (ExMtHsVv) e “ <i>in vitro</i> ” de <i>Hyptis marruboides</i> (ExMtHmVt), <i>Hyptis pectinata</i> (ExMtHpVt) e <i>Hyptis suaveolens</i> (ExMtHsVt).	138
Figura 4.16 EC ₅₀ do padrão quercetina e dos extratos metanólicos de plantas “ <i>in vivo</i> ” de <i>Hyptis marruboides</i> (ExMtHmVv), <i>Hyptis pectinata</i> (ExMtHpVv) e <i>Hyptis suaveolens</i> (ExMtHsVv) e “ <i>in vitro</i> ” de <i>Hyptis marruboides</i> (ExMtHmVt), <i>Hyptis pectinata</i> (ExMtHpVt) e <i>Hyptis suaveolens</i> (ExMtHsVt).	138
Figura 4.17 Microplaca demonstrativa do ensaio de oxidação do β-caroteno /ácido linoléico ao final de 60 minutos.	140
Figura 4.18 – Inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico pela ação antioxidante da quercetina e dos extratos metanólicos de plantas “ <i>in vivo</i> ” de <i>Hyptis marruboides</i> (ExMtHmVv), <i>Hyptis pectinata</i> (ExMtHpVv) e <i>Hyptis suaveolens</i> (ExMtHsVv) e “ <i>in vitro</i> ” de <i>Hyptis marruboides</i> (ExMtHmVt), <i>Hyptis pectinata</i> (ExMtHpVt) e <i>Hyptis suaveolens</i> (ExMtHsVt).	141
Figura 4.19 EC ₅₀ do padrão quercetina e dos extratos metanólicos de plantas “ <i>in vivo</i> ” de <i>Hyptis marruboides</i> (ExMtHmVv), <i>Hyptis pectinata</i> (ExMtHpVv) e <i>Hyptis suaveolens</i> (ExMtHsVv) e “ <i>in vitro</i> ” de <i>Hyptis marruboides</i> (ExMtHmVt), <i>Hyptis pectinata</i> (ExMtHpVt) e <i>Hyptis suaveolens</i> (ExMtHsVt). Cada coluna representa a média ± E.P.M. considerando os resultados obtidos a partir de três experimentos independentes. As amostras foram comparadas entre si pelo teste t. Todos os valores são estatisticamente diferentes (p≤0,005), exceto aqueles marcados com a mesma letra.)	141
Figura 4.20 Microplaca demonstrativa do ensaio FRAP.	143
Figura 4.21 Redução do Fe ³⁺ pela ação de antioxidantes da quercetina e dos extratos metanólicos das plantas “ <i>in vivo</i> ” de <i>Hyptis marruboides</i> (ExMtHmVv), <i>Hyptis pectinata</i> (ExMtHpVv) e <i>Hyptis suaveolens</i> (ExMtHsVv) e “ <i>in vitro</i> ” de <i>Hyptis marruboides</i> (ExMtHmVt), <i>Hyptis pectinata</i> (ExMtHpVt) e <i>Hyptis suaveolens</i> (ExMtHsVt). Os valores são provenientes de três experimentos triplicados independentes e representados com média ± E.P.M.....	144
Figura 4.22 EC ₅₀ do padrão quercetina e dos extratos metanólicos de plantas “ <i>in vivo</i> ” de <i>Hyptis marruboides</i> (ExMtHmVv), <i>Hyptis pectinata</i> (ExMtHpVv) e <i>Hyptis suaveolens</i> (ExMtHsVv) e “ <i>in vitro</i> ” de <i>Hyptis marruboides</i> (ExMtHmVt), <i>Hyptis pectinata</i> (ExMtHpVt) e <i>Hyptis suaveolens</i> (ExMtHsVt).....	144
 CAPÍTULO 5 – Atividade antibacteriana dos extratos de <i>Hyptis</i> spp.	
Figura 5.1 – Imagem ilustrativa da organização das microplacas utilizadas no ensaio de determinação da concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição em caldo dos extratos metanólicos, de acetato de etila e de diclorometano das folhas de Hm, Hp e Hs.....	154
Figura 5.2 – Fotos identificando os poços que apresentaram a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano (CIM) e os poços sem CTT dos quais coletou-se amostra para determinação da CBM e dos efeitos bactericidas e bacteriostáticos.	157
Figura 5.3. Fotos das placas utilizadas para a determinação da CBM e para caracterização do efeito farmacológico em bactericida ou bacteriostático.....	158
 CAPÍTULO 6 – Atividade hepatoprotetora de extratos de <i>Hyptis</i> spp. na linha celular HepG ₂	
Figura 6.1 Citotoxicidade de diferentes concentrações de extratos de Hm, Hp e Hs (500, 250, 100 E 10 µg/ml) na linha celular HepG ₂	171

Figura 6.2 Citoproteção de diferentes concentrações de extratos de Hm, Hp e Hs (500, 250, 100 E 10 µg/ml) na linha celular HepG ₂	174
Figura 6.3 Citoproteção de diferentes concentrações de extratos de Hm, Hp e Hs (500, 250, 100, 50 e 10 µg/ml) na linha celular HepG ₂	175
Figura 6.4 Produção de EROs após pré-tratamento (células pre-tratadas com extratos de Hm, Hp e Hs a 100µg/ml por 20 hs com posterior adição de t-BHP a 0,5mM) na linha celular HepG ₂	178
Figura 6.5 Produção de NO. Células HepG ₂ semeadas em placas de 12 poços foram tratadas com extratos de <i>Hyptis</i> spp. a 100µg/ml por 2hs seguida por estimulação com LPS por 20hs...	180
Figura 6.6 Viabilidade celular das células HepG ₂ estimuladas por LPS e tratadas com extratos de <i>Hyptis</i> spp.	180

ABREVIACOES, SÍMBOLOS E SIGLAS

2,4-D	cido 2,4-diclorofenoxiacético
AB	Atividade biológica
Ab	Absorbância do branco da amostra
ABTS	Sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzenotiazolina6-sulfônico)
Ac	Absorbância do controle vida
AcOEt	Extrato de acetato de etila
Ae	Absorbância da amostra
Af	Absorbância registrada no estado de equilíbrio
Ai	Absorbância inicial registrada no tempo zero
AL	Alimentação
Am	Absorbância do meio
AMP	Ampicilina sódica
ANA	cido naftaleno acético
AR	cido rosmarinico
AS	cido salicilico
ATCC®	American Type Culture Collection
atm	Atmosfera
ATP	Trifosfato de adenosina
B16	Pele murina
BAP	6-benzilaminopurina
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CBM	Concentração bactericida mínima
CCl ₄	Tetracloroeto de carbono
CEM	Leucemia humana
CHL	Cloranfenicol
CIM	Concentração inibitória mínima
Cin	Cinetina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMH	Caldo Müller Hinton
CN	Controles negativo
CO ₂	Gás carbnico
CP	Controles positivo
CQ	Composição química
CTT	Solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
DCF	Diclorofluorescena
DCFH-DA	2,7 dicloro-fluoresceína diacetato
DCM	Diclorometano
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Mdium
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	cido desoxirribonucleico
DPPH	1,1-Difenil-2-picril-hidrazil
E.P.E	Erro Padrão da Média
EL	Extrato de levedura
ERN	Espécies reativas de nitrogênio

ERO	Espécies reativas de oxigênio
ESI	Ionização por electrosplay
ExMtHmVt	<i>Hyptis marrubioides in vitro</i>
ExMtHmVv	<i>Hyptis marrubioides in vivo</i>
ExMtHpVt	<i>Hyptis pectinata in vitro</i>
ExMtHpVv	<i>Hyptis pectinata in vivo</i>
ExMtHsVt	<i>Hyptis suaveolens in vitro</i>
ExMtHsVv	<i>Hyptis suaveolens in vivo</i>
FBS	Soro fetal bovino
Fe ²⁺	ns ferrosos
Fe ³⁺	n férrico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FRAP	Poder de redução do ion ferro
Gbm	Gliablastoma
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCT-8	Clon humano
HCT-8	Clon humano
HepG ₂	Linha celular de carcinoma hepatocelular humano
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HL-60	Leucemia humana
Hm	<i>Hyptis marrubioides</i>
HO·	Radical Hidroxil
Hp	<i>Hyptis pectinata</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta eficiência
HPLC-DAD-Ms	Cromatografia Líquida de Alta eficiência acoplada a espectrometria de massa
Hs	<i>Hyptis suaveolens</i>
hs	Horas
HT29	Carcinoma do cólon
IAM	Interferência das amostras (extratos e antibióticos) sobre o CMH
IC ₅₀	Concentração da amostra testada que induz metade do efeito máximo (50%)
ICA	Atividade Quelante do Ferro
IFGoiano	Instituto Federal Goiano
IMR-32, LA-N-1 e SK-N-SH	Neuroblastomas
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ISC	Interferência do crescimento bacteriano
ISM	Interferência dos sistemas solvente/diluente sobre o CMH
KB	Carcinoma epidermóide
LCCA	Laboratório de cultura de células animais
LCTV	Laboratório de cultura e tecidos vegetais
LPS	Lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
MCF-7	Mama humana
MeJ	Metil Jasmonato
MeOH	Metanol 80%
MS	Murashige e Skoog
MtS	Metabólitos secundários
MTT	Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT	Azul de nitrotetrazólio
NED	Naftildetilenodiamina
NO	xido nítrico
NO	xido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NPPB	5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoate
O ²	Oxigênio
O ^{2·-}	ânion radical superóxido
OE	leo essencial
OH	Radicais hidroxila
OH ⁻	íon de hidróxido
OH ⁺	íon hidrnio
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONOO ⁻	Anies Peroxinitrito
ORAC	Capacidade de Absorbância do Radical Oxigênio
PBS	Solução salina tamponada de fosfato
PG	Propil galato
pH	Potencial do hidrogênio
PMS	Metasulfato de fenazina
PRISMA	Principais Itens para Relatar Revisões Sistemáticas e Meta-Análises
rpm	Rotações por minuto
S	Sul
SE	Solução estoque
SNP	Solução de Nitroprussiato de sódio
spp.	Referência a várias espécies do gênero
TBARS	Substâncias Reativas ao cido Tiobarbitúrico
t-BHP	Hidroperóxido de terc-butila
TBHQ	Terc-butil-hidroquinona
TO	Toxicologia
TPTZ	Tripiridiltriazina
TR	Tempo de retenção
UFC	Unidades formadoras de colnia
UV	Ultravioleta
W	Norte

O presente trabalho foi parcialmente financiado pelo Instituto Federal Goiano/Campus Morrinhos, por meio de Bolsa do Programa Institucional de Qualificação – PIQ IF GOIANO edital n° 02/2013

Alguns experimentos desenvolvidos neste trabalho tiveram a importante colaboração das investigadoras:

Dra. Maria Silvana (análises microbiológicas desenvolvidas no Brasil, Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora),

e

Dra. Vanessa Magalhães (análises relacionadas a linhagem celular HepG2 e BV2, desenvolvidas no laboratório de cultura de células animais da Universidade do Minho)

*À Nossa Senhora Aparecida
que me cobriu com seu manto sagrado e
acalentou meu coração nos bons e maus momentos
desta caminhada*

A minha tão amada família

*A minha saudosa Laika (Lá e Ká),
que partiu quando eu estava em Terras Portuguesas.
“Ainda escuto seus passos pela casa”.
Saudades!!!*

*Tudo o que descobrimos ainda é apenas um pouco em comparação
com o que está escondido no grande tesouro da natureza.*

Antonie van Leewenhoek (1680)

Capítulo 1

INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 BIODIVERSIDADE: A MATÉRIA-PRIMA DA BIOPROSPECÇÃO BRASILEIRA

O território brasileiro, com cerca de 8,5 milhões de quilômetros quadrados, tem aproximadamente 4.500 quilômetros de norte a sul e também de leste a oeste, sendo o 5º maior país do mundo (Newman, 2017). Ele abarca uma posição geográfica privilegiada, com clima, humidade, solos, relevos, vegetação e fauna diversificados que interagem entre si formando ecossistemas únicos (Varella, 1997). Estes diferentes ecossistemas proporcionaram ao país a concentração da maior biodiversidade do mundo estimada em 20% do número total de espécies do planeta (Brazil, 2003; Boroni, 2010; Oliveira *et al.*, 2017). Há espécies endêmicas, espécies de importância econômica mundial (abacaxi, amendoim, castanha do Brasil, mandioca, caju, carnaúba entre outros), além, é claro, de uma enorme diversidade de povos indígenas e comunidades diversas com conhecimentos tradicionais associados à biodiversidade brasileira (Brazil, 2003).

A biodiversidade, definida pela Convenção da Diversidade Biológica (1992) como “a variabilidade entre organismos vivos de todas as fontes incluindo a diversidade dentro das espécies, entre as espécies e ecossistemas”, é considerada um recurso de grande valor intrínseco, social, econômico, científico, cultural, recreativo, ético e estético. É responsável pelo fornecimento de serviços ambientais imprescindíveis – como regulação climática, ciclagem de nutrientes, formação de solos, polinização, assimilação de resíduos, fornecimento de água, entre outros (Saccaro Junior, 2011).

Todavia, os avanços dos impactos de atividades humanas com consequente destruição de habitats e aumento da utilização dos recursos naturais vem comprometendo direta e indiretamente a biodiversidade e despertando uma crescente preocupação a nível mundial. Isso acontece porque com a perda de alguns serviços ecossistêmicos, será impossível desfrutar-se do mesmo nível de bem-estar no futuro, dada a irreversibilidade de ambientes naturais convertidos (Krutilla, 1967; Krutilla e Fisher, 1976; Farley, 2012). É pouco provável que a tecnologia avance a ponto de reproduzir paisagens

geomorfológicas e ressuscitar espécies extintas (Krutilla, 1967). E, mesmo que isso fosse possível, as réplicas feitas não teriam valor equivalente ao dos originais. Outro motivo de preocupação refere-se à estimativa de que mais de 90% da diversidade biológica do Brasil e do Planeta sejam desconhecidas (Ferreira e Sampaio, 2013) e que espécies supostamente importantes poderiam ser perdidas antes mesmo de serem estudadas.

Diante deste contexto, pode-se afirmar que os seres humanos dependem da rede profundamente interconectada da biodiversidade para sua própria sobrevivência e que a necessidade de medidas de proteção a biodiversidade se fazem necessárias (Farley, 2012).

Segundo Pushpangadan e colaboradores (2018), o sucesso de uma nação depende da capacidade inerente seu povo de converter a biodiversidade e outros recursos naturais em riqueza de maneira ecologicamente correta e economicamente gratificante e sustentável com a intervenção da ciência e tecnologia. Nesse intuito, o desenvolvimento da pesquisa científica e tecnológica e conhecimentos tradicionais associados poderia contribuir para ampliar informações sobre a biodiversidade, e permitir a conservação e a utilização sustentável de seus componentes por meio da produção de fármacos, cosméticos, alimentos, novos materiais, além de manter os serviços proporcionados pelos ecossistemas. Tal situação possibilitaria, por exemplo, o uso da biotecnologia para manipulação da vida ao nível genético, potencializando largamente seus usos e aplicações e ampliando o interesse de importantes segmentos econômicos e industriais na biodiversidade (Albagli, 1998).

O fato do Brasil possuir grande potencial para desenvolvimento de bioprodutos de grande impacto a partir de plantas, capazes de gerar riquezas e contribuir para a balança econômica nacional, tem ocasionado o surgimento de uma diversidade de estudos de bioprospecção. A biosprospecção surge como uma ferramenta importante ao acesso de novas estratégias para a investigação, desenvolvimento e exploração dos recursos medicinais derivados da flora (Albuquerque, 2010; Ribeiro *et al.*, 2013). Quando focada na biologia e fitoquímica de plantas pode auxiliar na comprovação dos usos tradicionais de plantas pelas populações locais e proporcionar a obtenção de novos agentes fitoterápicos. Por esse motivo, explorar as prováveis atividades biológicas de espécies vegetais configura-se uma medida estratégica para o Brasil em prol da descoberta de meios alternativos de tratamento de doenças oriundas desse país e como mola propulsora da economia, tornando o tema deste trabalho relevante para o desenvolvimento científico.

1.2 PLANTAS MEDICINAIS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As plantas medicinais, distribuídas entre os diversos habitats e elementos da paisagem, há tempos vem sendo empregadas com fins medicinais ou como fitoterápicos em todo o Mundo (Atanasov *et al.*, 2016; Dar *et al.*, 2017). Estas gozam de uma posição significativa nas indústrias farmacêuticas modernas, devido às poucas evidências sobre efeitos colaterais e à ação sinérgica da combinação de compostos (Dar *et al.*, 2017).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as plantas medicinais são as melhores fontes para a obtenção de uma ampla gama de moléculas com princípios bioativos e, portanto, representam um importante reservatório para a identificação de novas drogas (Atanasov *et al.*, 2016). Os princípios bioativos de plantas, também conhecidos como metabólitos secundários (Mts), são derivados dos produtos do metabolismo primário (carboidratos, lipídios e proteínas) associados diretamente ao crescimento e metabolismo básico de todas as plantas (Aharoni e Galili, 2011; Lavecchia *et al.*, 2013; Chikezie *et al.*, 2015). Os Mts são frequentemente produzidos sob estresse, tanto biótico (bactérias, fungos, nematóides, insetos ou herbivoria por animais) quanto abiótico (temperatura e humidade, ultravioleta, fermentos ou presença de metais pesados) (Aharoni e Galili, 2011; Lavecchia *et al.*, 2013; Pagare *et al.*, 2015). Eles são os principais contribuintes do odor específico, cor e sabor das partes da planta.

Todas as plantas produzem Mts sob condições ambientais específicas que são características para cada espécie, gênero e/ou família, o que dificulta sua extração e purificação (Pagare *et al.*, 2015). Esses metabólitos são classificados em três categorias principais que são os compostos fenólicos, os terpenos e os compostos nitrogenados cuja a formação está ligada à existência de quatro vias biossintéticas: a via do ácido malônico, a via do ácido mevalônico, a via do ácido chiquímico e a via do metileritritol fosfato (Figura 1.1) (Parsaeimehr *et al.*, 2011).

Os terpenos derivam da via do ácido mevalônico ou da via do metileritritol fosfato (derivada do piruvato ou do 3-fosfoglicerato). Os compostos fenólicos são derivados da via do ácido chiquímico ou da via do ácido malônico e os compostos nitrogenados são derivados de aminoácidos alifáticos (derivados do ciclo do ácido tricarboxílico) ou de aminoácidos aromáticos (derivada do ácido chiquímico).

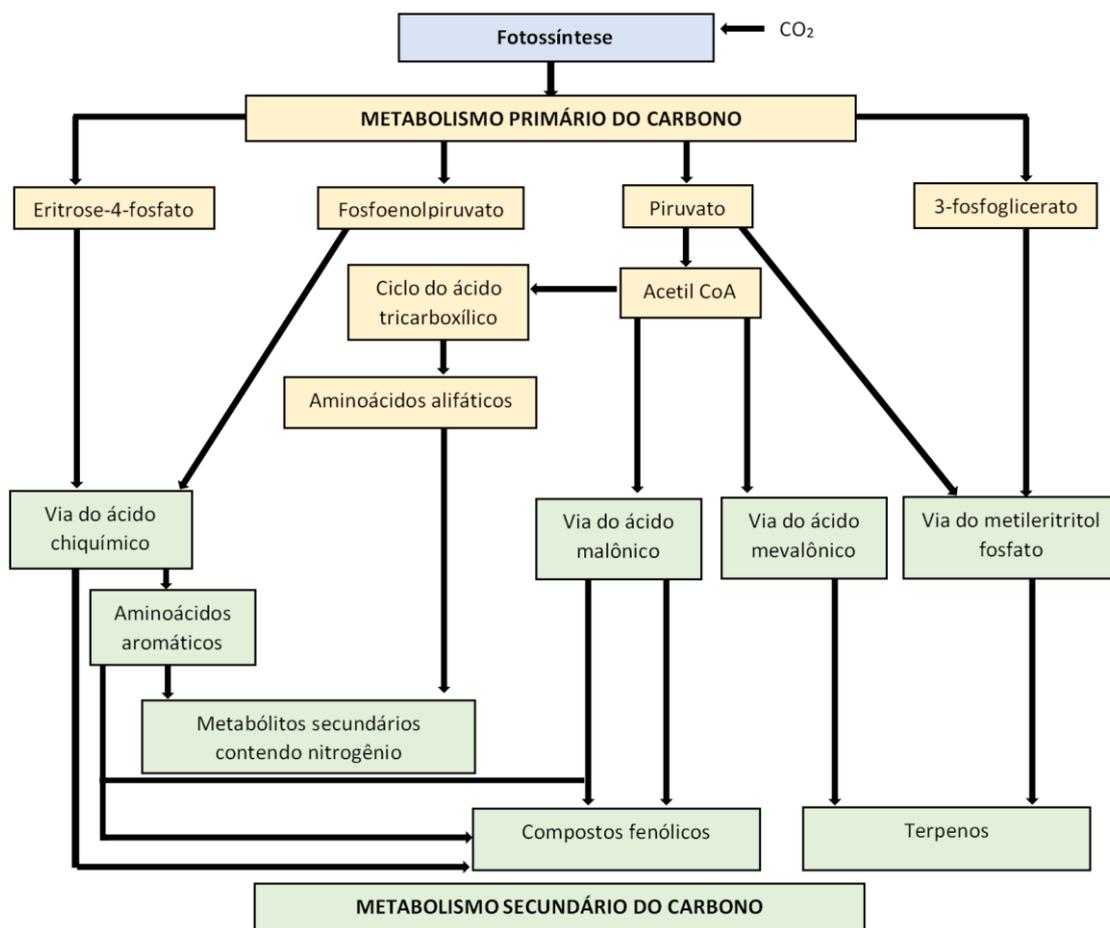


Figura 1.1- Visão geral das principais vias biossintéticas dos metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário nas plantas. Fonte: Adaptado de Verma e Shukla, 2015.

1.2.1 Compostos fenólicos

Atualmente um grande número de estudos tem dado especial atenção à natureza antioxidante dos compostos fenólicos presentes em frutas, vegetais, ervas, raízes, folhas e sementes de muitas plantas. Estes compostos são de estrutura diversa sendo formados por um ou mais grupos hidroxila (OH) ligado (s) diretamente a um anel aromático (Figura 1.2).

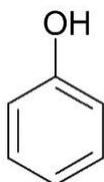


Figura 1.2 – Grupo fenol. Acesso em 25/10/2018. Disponível em: <https://www.oblogdomestre.com.br/2012/11/fenois.html>

Os fenólicos estão presentes na parede celular das plantas na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos), ácidos orgânicos e outras biomoléculas como compostos que são insolúveis em água (taninos condensados) ou solúveis em água (flavonoides, ácidos fenólicos e quinonas) (Skrovankova *et al.*, 2015). Eles atuam na adaptação da planta a condições de estresse ambiental, na defesa contra radiações ultravioletas ou agressão por patógenos (Crozier *et al.*, 2006).

O conteúdo dos compostos fenólicos pode variar de acordo com a estação do ano, variedade, condições ambientais e climáticas, estado de saúde, tipo de solo e diferentes fases de crescimento e desenvolvimento da planta (Lattanzio, 2013; Cezarotto *et al.*, 2017). Estes são considerados um dos mais importantes grupos de metabólitos secundários de plantas, devido a sua atividade farmacológica bastante expressiva pela presença de substâncias antioxidantes responsáveis pelo combate de radicais livres capazes de provocar o surgimento de várias patologias que acometem a saúde humana (Lin *et al.*, 2016; Huyut *et al.*, 2017). Sua atividade antioxidante é demonstrada através de mecanismos de transferência eletrônica, mecanismos de transferência de átomos de hidrogênio e quelação de metais de transição (Castañeda-Arriaga *et al.*, 2018). Os compostos fenólicos podem ser classificados de acordo com o seu esqueleto de átomos de carbono (Figura 1.3).

1.2.1.1 Flavonoides

Os flavonoides, um grupo de substâncias naturais com estruturas fenólicas variáveis, são encontrados em frutas, legumes, grãos, casca, raízes, caules, flores, chá e vinho (Panche *et al.*, 2016). São compostos por quinze carbonos, com dois anéis aromáticos ligados por uma ponte de três carbonos que formam um anel heterocíclico oxigenado, resultando na estrutura $C_6-C_3-C_6$ (Crozier *et al.*, 2006). Podem se apresentar como agliconas, glicosídeos ou fazerem parte de outros compostos químicos, como as flavolignanas (Kumar e Pandey, 2013).

Os flavonóides tem sido utilizado em uma variedade de aplicações nutracêuticas, farmacêuticas, medicinais e cosméticas, por causa de suas propriedades anti-oxidativas, anti-inflamatórias, anti-mutagênicas e anti-carcinogênicas, juntamente com sua capacidade de modular a função chave da enzima celular (Panche *et al.*, 2016). Devido à sua diversidade estrutural, eles podem ser subdivididos em subclasses que incluem as flavonas, flavonóis, flavanóis, flavononas, isoflavonas e antocianinas

(Figura 1.4). Dentro de cada classe pode ocorrer substituições (oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfatação) nos anéis A e B que dão origem a diferentes compostos.

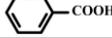
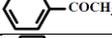
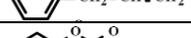
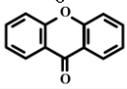
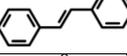
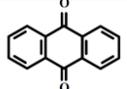
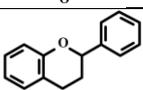
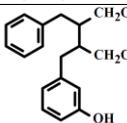
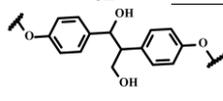
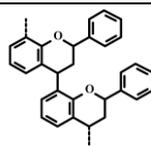
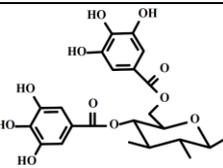
C_6	-	Fenóis simples	
	-	Benzoquinonas	
C_6-C_n	C_6-C_1	Ácidos fenólicos	
	C_6-C_2	Acetofenonas	
	C_6-C_2	Ácidos fenilacéticos	
	C_6-C_3	Hidroxicinamas	
	C_6-C_3	Fenilpropanóides	
	C_6-C_3	Cumarinas	
	C_6-C_3	Cromonas	
	C_6-C_4	Naftoquinonas	
$C_6-C_n-C_6$	$C_6-C_1-C_6$	Xantonas	
	$C_6-C_2-C_6$	Estilbenos	
	$C_6-C_2-C_6$	Antraquinonas	
	$C_6-C_3-C_6$	Flavonoides	
$(C_6-C_3)_n$	$(C_6-C_3)_2$	Lignanais	
	$(C_6-C_3)_{2+n}$	Ligninas	
$(C_6-C_3-C_6)_n$	-	Taninos condensados	
$(C_6-C_1)_{glicosídeos}$	-	Taninos hidrolisáveis	

Figura 1.3 – Classificação dos compostos fenólicos. Fonte: adaptado de O'Connell e Fox, 2001.

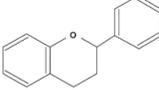
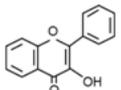
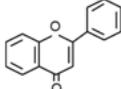
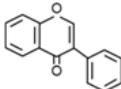
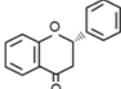
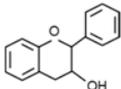
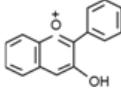
Classe	Subclasse	Esqueleto básico	Estrutura básica
Flavonoides 	Flavonóis	C6 – C3 – C6	
	Flavonas	C6 – C3 – C6	
	Isoflavonas	C6 – C3 – C6	
	Flavanonas	C6 – C3 – C6	
	Flavanóis	C6 – C3 – C6	
	Antocianinas	C6 – C3 – C6	

Figura 1.4 – Classificação dos flavonoides. Fonte: Adaptado de Hajiaghaalipour *et al.*, 2015.

A *flavona* (C₁₅H₁₀O₂), denominada quimicamente como 2-fenilcromen-4-ona (2-fenil-1-benzopiran-4-ona) é composta por um esqueleto de três anéis, ligados como C₆-C₃-C₆, que são designados como A, B e C, respectivamente (Wasim *et al.*, 2017). Elas tem coloração amarelada e estão presentes em frutas e vegetais sendo solúveis em água e etanol (Singh *et al.*, 2014). As flavonas têm recebido grande interesse pelo seu potencial antioxidante e pela capacidade de modular vários sistemas enzimáticos envolvidos em diversas doenças (Singh *et al.*, 2014). Entre os representantes destaca-se a apigenina e a luteolina.

Os *flavonóis* são caracterizados pela presença de uma insaturação no anel heterocíclico, um átomo de oxigênio em C4 e um grupo hidroxila na posição 3 (Oliveira *et al.*, 2014a). Eles são encontrados em frutas e legumes e ocorrem naturalmente como glicosídeos (com grupos glicosilados) ou agliconas (Leo e Woodman, 2015; Jeganathan *et al.*, 2016). A miricetina, quercetina e kaempferol e outros flavonóis podem desempenhar um papel importante na redução do risco de doença cardiovascular, câncer e doenças neurodegenerativas através dos mecanismos de ação antioxidante, anti-inflamatória, vasorelaxante e de modulação das vias de sinalização (Jeganathan *et al.*, 2016).

Os *isoflavonoides* (ou isoflavonas) estão presentes no reino vegetal, mas se acumulam predominantemente em plantas leguminosas como a soja cujas os principais representantes são daidzeína, genisteína e a gliciteína. Os isoflavonoides possuem uma diversidade de estruturas que podem

ser justificadas pelos diferentes níveis de oxidação do esqueleto, pela presença de anéis heterocíclicos adicionais e pela diversidade de substituintes (Danciu *et al.*, 2017). Além de propriedades anti-inflamatórias, antimicóticas e sequestradoras de radicais livres, eles também exibem efeitos estrogênicos e antiestrogênicos e por isso são chamados de fitoestrógenos (Hanganu *et al.*, 2010). Outras atividades biológicas estão associadas a redução na osteoporose, a doença cardiovascular, a prevenção do câncer e para o tratamento dos sintomas da menopausa (Sharma e Ramawat, 2013).

As *flavanonas* são representadas pelo anel heterocíclico saturado (C) e são encontrados em tomates, plantas aromáticas como hortelã e, principalmente, em frutas cítricas (Yao *et al.*, 2004; Manach *et al.*, 2004; Kumar e Pandey, 2013). São geralmente glicosiladas na posição 7 por um dissacarídeo (neohesperidose, rutinose) ou, por um monossacarídeo (glicose) (Manach *et al.*, 2004). Os principais representantes são as naringenina, hesperetina e eriodictiol. As flavanonas presentes no gênero *Citrus* influenciam positivamente os parâmetros cardio-metabólicos, prevenindo doenças cardiovasculares (Testai e Calderone, 2017).

Os *flavanóis* existem em monômero (catequinas) ou na forma de polímero (proantocianidinas) estando presentes em uma ampla variedade de plantas e alimentos derivados de plantas, como frutas, cereais, sementes, vinhos, cidras, chás, cervejas e cacau (Lin e Harnly, 2012; Oliveira *et al.*, 2014b). Como outros flavonóides, os flavanóis são bons agentes redutores que apresentam importantes propriedades antioxidantes e eliminadoras de radicais. Eles podem melhorar a função vascular mesmo em indivíduos saudáveis e apresentam um papel protetor contra vários tipos de câncer (Oliveira *et al.*, 2014b; Rodriguez-Mateos *et al.*, 2018).

As *antocianinas* são glicosídeos que, por hidrólise ácida, liberam agliconas também denominadas de antocianidinas (Lima *et al.*, 2006; Khoo *et al.*, 2017). As antocianinas são responsáveis pelas várias tonalidades entre laranja, vermelho e azul, exibidas pelas hortaliças, flores, folhas, raízes e, principalmente, pelos frutos como groselha preta, framboesa, uvas, maçãs, tomates. (Lila, 2004; Lima *et al.*, 2006; Miguel, 2011). A cianidina-3-glicosídeo é encontrada na maioria das plantas (Khoo *et al.*, 2017). Devido à sua estrutura química, as antocianinas são capazes de reagir com muitas substâncias ativas no corpo humano (Kowalczyk *et al.*, 2003). Elas possuem efeitos antidiabéticos, anticâncer, antiinflamatório, antimicrobiano, anti-obesidade, melhoram a saúde visual e neurológica e ajudam na prevenção de doenças cardiovasculares (Kowalczyk *et al.*, 2003; Khoo *et al.*, 2017).

1.2.1.2 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos estão amplamente distribuídos em raízes, folhas, frutas e legumes das plantas e ocorrem na forma de ésteres, glicosídeos ou amidas, mas raramente na forma livre (Khoddami *et al.*, 2013). Estes ácidos fenólicos só podem ser hidrolisados ou libertados por hidrólise alcalina ou ácida, ou por enzimas (Tsao, 2010; Shahidi e Yeo, 2016).

Os ácidos fenólicos são compostos muito simples com estrutura formada por um ou mais anéis aromáticos e com pelo menos uma função de ácido carboxílico orgânico (Goleniowski *et al.*, 2013). Eles desempenham um papel fundamental nos mecanismos de defesa antioxidante em sistemas biológicos, exibem efeitos promotores de saúde e podem ter efeitos inibitórios na mutagênese e na carcinogênese (Ivanauskas *et al.*, 2008).

De acordo com as unidades de carbono da cadeia lateral ligada ao anel aromático, os ácidos fenólicos consistem em dois subgrupos (Figura 1.5): os ácidos hidroxibenzoicos que possuem a estrutura C6-C1 e os ácidos hidroxicinâmicos que possuem a estrutura C6-C3 (Balasundram *et al.*, 2006). Embora o esqueleto básico permaneça o mesmo, os números e posições dos grupos hidroxila no anel aromático criam as variedades (Robbins, 2003; Goleniowski *et al.*, 2013).

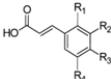
Classe	Subclasse	Esqueleto Básico	Estrutura básica
Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxibenzoicos	C6 – C1	
	Ácidos hidroxicinâmicos	C6 – C3	

Figura 1.5 – Duas importantes classes dos ácidos fenólicos. Fonte: Adaptado de Goleniowski *et al.*, 2013

Entre os derivados do *ácido hidroxicinâmico* podemos citar os ácidos ferúlico, cafeico, p-cumárico, sinápico e o ácido rosmarínico, enquanto os derivados do *ácido hidroxibenzoico* consistem em ácidos gálico, protocatecóico, vanílico e siringico (Khoddami *et al.*, 2013). O ácido cafeico e o ácido gálico apresentam fortes propriedades antioxidantes e agem como aceitadores de radicais livres (Ivanauskas *et al.*, 2008). Os ácidos clorogênico, cafeico, ferúlico, gálico tem demonstrado atividade citoprotetora e possíveis efeitos inibitórios na carcinogênese, mutagênese e gênese do tumor (Ivanauskas *et al.*, 2008). Já o ácido rosmarínico apresenta propriedades biológicas relevantes como antioxidantes, antitumorais,

anti-inflamatória, anti-alérgicas, imuno-estimuladoras, antidepressivas, anti-Alzheimer e antimicrobianas (Kim *et al.*, 2015; Bhatt *et al.*, 2013; Hossan *et al.*, 2014).

1.3 Família *Lamiaceae*: gênero *Hyptis*

Várias plantas se destacam na flora brasileira, entre elas as da família *Lamiaceae*, por possuírem valor alimentício e presença de grande variedade de metabólitos secundários, como, terpenoides, compostos fenólicos, lactonas, lignanas e ácidos gordos que lhes agregam propriedades farmacológicas e medicinais. Apresentando distribuição cosmopolita, esta família é encontrada em várias partes do mundo, pertencente à Ordem *Tubiflorae* (Lamiales), abrangendo cerca de 236 gêneros e mais de 7.000 espécies (Li *et al.*, 2016; Khoury *et al.*, 2016; Brahmi *et al.*, 2017).

Grande parte dos representantes da família *Lamiaceae* são ervas perenes ou anuais com caules quadrados; outros são arbustos ou subarbustos lenhosos (Brahmi *et al.*, 2017). As folhas geralmente apresentam óleos essenciais e aroma e todas são simples e dispostas de maneira oposta (Raja *et al.*, 2001; Brahmi *et al.*, 2017). As flores são bissexuais e zigomorfas simétricas bilateralmente, compostas por cinco pétalas unidas e profundamente lobadas e cinco sépalas unidas e os frutos são secos (Raja *et al.*, 2001; Brahmi *et al.*, 2017).

Algumas destas plantas como o alecrim (*Rosmarinus*), tomilho (*Timo*), manjeriço (*Ocimum*), orégano (*Origanum*), sálvia (*Salvia*), hortelã e hortelã-pimenta (*Mentha*), bamburral (*Hyptis*) tem uso comercial importante nas indústrias de culinária, farmacêutica e medicinal (Li *et al.*, 2016; Khoury *et al.*, 2016). O gênero *Hyptis* apresenta uma grande diversidade morfológica sendo composto por aproximadamente 400 espécies na forma de pequenas ervas a arbustos de grande porte, que estão distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (Silva-Luz *et al.*, 2012), principalmente Américas, mas também encontradas na África, Índia, sudeste Asiático e Austrália (Flores *et al.*, 2014).

Espécies do gênero *Hyptis* se caracterizam pela presença de substâncias com um amplo espectro de atividades biológicas e farmacológicas, como antibacteriana (Goly *et al.*, 2015; Salini *et al.*, 2015; Tesch *et al.*, 2015; Bachheti *et al.*, 2015; Kerdudo *et al.*, 2016; Andrade *et al.*, 2017b; De Figueirêdo *et al.*, 2018), antifúngica (Khonkarn *et al.*, 2015; Bachheti *et al.*, 2015; Falcão *et al.*, 2016; Kerdudo *et al.*, 2016; Begum *et al.*, 2016b; Simões *et al.*, 2017; Muthamil *et al.*, 2018;), anti-inflamatória (Raymundo *et al.*, 2011; Miranda *et al.*, 2013; Bayala *et al.*, 2014; Dos Anjos *et al.*, 2017;), citotóxica

(Barbosa *et al.*, 2012; Hamada *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2013a; Deepika *et al.*, 2013; De Figueirêdo *et al.*, 2018), genotóxica (Sumitha e Thoppil, 2016), neuroprotetora (Ghaffari *et al.*, 2014), gastroprotetora (Diniz *et al.*, 2013; Jesus *et al.*, 2013; Caldas *et al.*, 2014; Rocha Caldas *et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2018), antioxidante (Deepika *et al.*, 2013; Ghaffari *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Bayala *et al.*, 2014; Serafini *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2018), antiproliferativa (Amado *et al.*, 2009).

Entre estas substâncias bioativas de espécies do gênero *Hyptis*, o ácido rosmarínico foi um dos destaques nos extratos vegetais (Kuhnt *et al.*, 1994; Kuhnt *et al.*, 1995; Falcao *et al.*, 2013). Em óleos essenciais, estudos revelaram a presença de monoterpenos oxigenados e hidrocarbonados (Oliveira *et al.*, 2014a; Tafurt-Garcia *et al.*, 2015; Sá *et al.*, 2016; Barbosa *et al.*, 2017), sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbonados (Flores *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2014a; Tafurt-Garcia *et al.*, 2015; Jesus *et al.*, 2016; Sá *et al.*, 2016; Bezerra *et al.*, 2017) e diterpenos (Martins *et al.*, 2007; Tonzibo *et al.*, 2009; Zellner *et al.*, 2009), além de várias outras substâncias.

1.3.1 Espécie *Hyptis marruboides* Epling

Hyptis marruboides Epling, também conhecida como hortelã-do-campo (Figura 1.6), é um subarbusto com propriedades aromáticas e medicinais. Morfologicamente a planta pode ser caracterizada como:

Subarbusto ou erva ramificada ca. 0,5 m alt., ramos tomentosos, tricomas tectores ou glandulares. Folhas pecioladas; peciolo 0,1-0,3 cm compr.; lâmina cartácea, elíptica, oval ou oboval, discolor, venação broquidódroma ou eucamptódroma, 2,1-5,5 cm compr., 0,8-1,1 cm larg., ápice arredondado ou obtuso, margem crenado-serrada, base cuneada, face adaxial densamente tomentosa, exceto nas nervuras secundárias, face abaxial densamente vilosa, ferrugíneo-tomentosa nas nervuras, tricomas tectores ou glandulares. Capítulo hemisférico; pedúnculo 0,2-0,3 cm compr.; brácteas semelhantes às folhas, mas geralmente menores. Flor: bractéolas involucrais lanceoladas, 3,7-4,3 mm compr., 1-1,2 mm larg., ápice acuminado, indumento como nas folhas; bractéolas internas estreitamente lanceoladas ou linear-lanceoladas, 2,2-3,1 mm compr., 0,3 mm larg., ápice agudo; cálice 2-3mm compr., tubular na flor, inflado, urceolado no fruto, lobos triangulares ou lineares, ápice do lobo acuminado, sem apêndice apical, face interna glabra, face externa densamente tomentosa na fauce, tricomas tectores ou glandulares; corola alva, 5 mm compr., 0,6 mm larg. na base, 1,2 mm diâm. na fauce, lobos ovais, ápice do lobo agudo ou arredondado, face interna subglabra, face externa tomentosa, tricomas tectores ou glandulares. Estilete articulado acima do ovário, estilopódio bem evidente, persistente. Núculas obovoides ou ovoides, 1,4-1,5 mm compr., 0,7-1 mm larg., ápice arredondado, coloração marrom, esparsamente tomentosas no ápice, verruculosas. (Silva-Luz *et al.*, 2012)

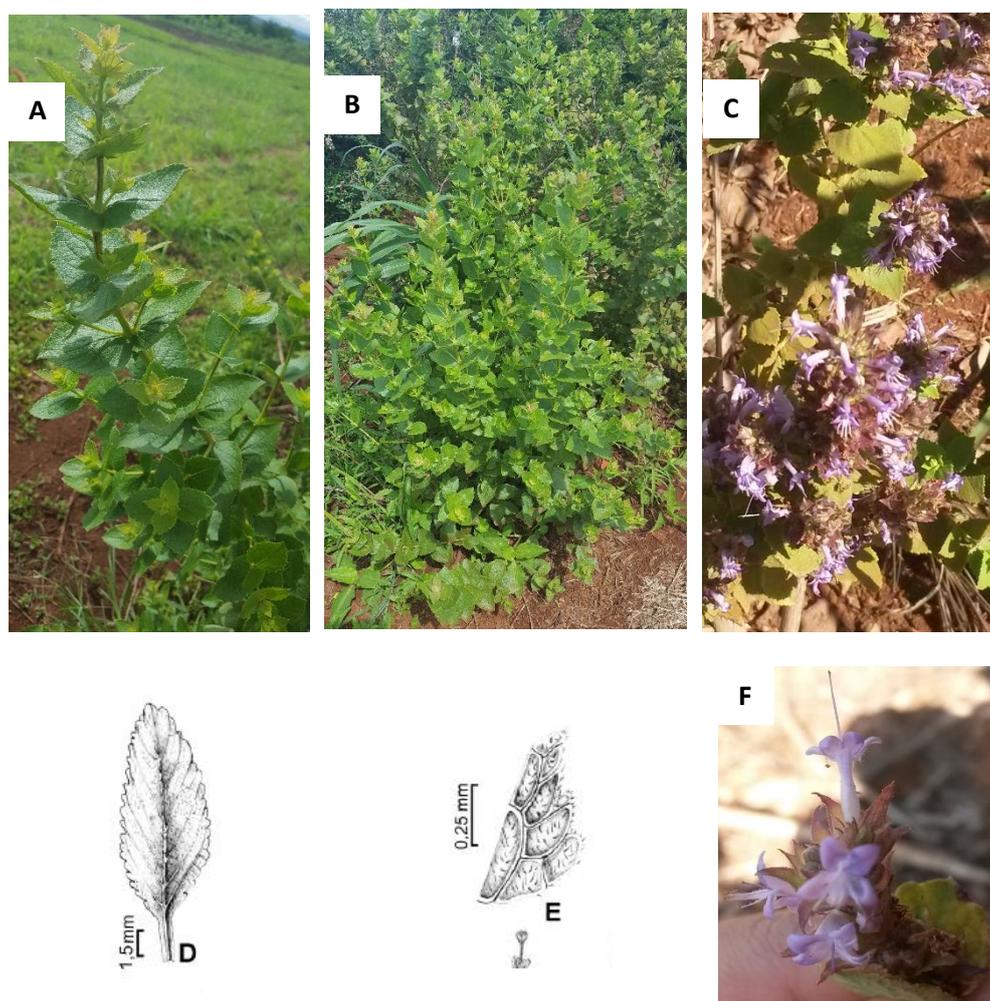


Figura 1.6 – Arbusto de *Hyptis marrubioides* Epling adulto *in situ* (A e B), Planta em floração (C e F), Vista adaxial da folha (D), Detalhe das nervuras, indumento e margem da folha (E). Fonte: (A, B, C e F) Elaborada pela própria autora, Rio Verde, Brasil, 2018; (D e E): Silva-Luz *et al.*, 2012.

H. marrubioides é uma espécie aromática que apresenta grande potencial biológico em razão de compostos biossintetizados pelo metabolismo secundário, dentre os quais se destacam os óleos essenciais. Os principais constituintes químicos encontrados nos óleos essenciais foram monoterpenos oxigenados e hidrogenados, como *cis*-tujona (Sales *et al.*, 2009), *trans*-tujona (Botrel *et al.*, 2010b), α -tujona e β -tujona (Botrel *et al.*, 2010a) e sesquiterpenos oxigenados e hidrogenados, como β -cariofileno, germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol, γ -muuroleno, eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol, α -cadinol (Botrel *et al.*, 2010b), α -copaeno, E-cariofileno, δ -muuroleno (Sales *et al.*, 2009).

Esta espécie aromática distribuiu-se pelas regiões centro-oeste, sudeste e sul do Brasil (Figura 1.7), sendo utilizada popularmente contra infecções gastrointestinais, infecções de pele, dores e câibras

(Botrel *et al.*, 2009). Há poucos estudos sobre suas propriedades bioativas, sendo que os dois registros encontrados falam do seu potencial antifúngico (Silva *et al.*, 2012a e Silva *et al.*, 2014a).



Figura 1.7 - Distribuição geográfica de *Hyptis marruboides* no Brasil. Há ocorrências confirmadas em Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Paraná. Fonte: *Lamiaceae in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB8227>>. Acesso em: 15 Nov. 2018.

1.3.2 Espécie *Hyptis pectinata* Poit..

A espécie *Hyptis pectinata* Poit., popularmente conhecida no Brasil como “sambacaitá”, “sambacaité”, “macaé”, “mercúrio-do-campo”, poejo-do-brejo” ou “canudinho”, é uma planta tipicamente ruderal, caracterizada como um subarbusto perene com galhos eretos capaz de se desenvolver em áreas campestres e antrópicas de grande parte do território brasileiro (Figura 1.8 e Figura 1.9) e com propriedades fitoterápicas. Apresenta baixa densidade foliar, além de produzir um número elevado de sementes com tamanhos diminutos (Santos Neto *et al.*, 2009). As flores são pequenas, agrupadas em inflorescências, hermafroditas, pentâmeras, zigomorfas e bilabiadas (Silva *et al.*, 2002; Santos Neto *et al.*, 2009). Basílio *et al.* (2006), descreveram morfológicamente a planta como sendo:

“Erva ou subarbusto, ereto, 1-2 m de altura, ramificado, piloso; caule e ramos quadrangulares, cinza-esverdeados. Folhas opostas; lâmina 1,0-2,5 x 0,8-1,6cm, oval ou oval-elíptica, ápice agudo, base obtusa ou obtuso-truncada, margem serreada ou crenada; pecíolo 0,5-1,0 cm. Inflorescências terminais, em panículas espiciformes densas, 60-100-flores; ráquis longa, 20-50 cm de comprimento. Flores curto-pediceladas, ca. 1,0 mm compr., protegidas por brácteas 2-4 mm, filiformes. Cálice 2-3 mm, tubuloso, inflado, glabrescente; 5-lacínios, subiguais, ca. 1 mm. Corola alva a rósea, bilabiada, lábio superior 4-laciniado, lábio inferior

cimbiforme; tubo estreito > 1 mm, 1-2 mm comprimento; 4-estames, anteras bitecas, transversais. Fruto ca. 1,0 mm, esquizocárpico, separando-se em quatro núculas, estreitas, oblongo-ovóides, inamente rugulosas, mucilaginosas.”



Figura 1.8 – Arbusto de *Hyptis pectinata* Poit. adulto (A e B), Desenho representativo do ramo florido, do cálice e da flor isolada. Fonte: A) https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Starr_001025-8001_Hyptis_pectinata.jpg; B) Basílio *et al.* 2006; C) Elaborada pela própria autora, Rio Verde, Brasil, 2018.

Quanto ao uso na medicina popular há relatos no Brasil sobre o uso para tratamento de rinfaringite, congestão nasal, doenças de pele, distúrbios gástricos, febre, infecções bacterianas, inflamações de garganta, dor e câncer (Tchoumboungang *et al.*, 2005; Raymundo *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2008; Nascimento *et al.*, 2008; De Queiroz *et al.*, 2014). As inflorescências de *Hyptis pectinata*,

quando secas, são usadas em forma de cigarro contra cefaléias e dores de dentes (Basílio *et al.*, 2006). O infuso é usado contra amenorréias e dismenorreias e o decocto das partes aéreas é indicado contra hepatalgias (Basílio *et al.*, 2006).

Entre os principais compostos bioativos, verificou-se a presença de ácido rosmarínico, ácido sambacaitárico, ácido 3-O-metil-sambacaitárico, ácido 3-O-metil-rosmarínico, etil caffeoato; nepetoidina A, nepetoidina B, circsiliol, circimaritina, 7-O-metil-luteolina, genkwanina (Falcao *et al.*, 2013), pectinolidas D, E, F e G (Boalino *et al.*, 2003), β -pineno (Nascimento *et al.*, 2008), terpinoleno, sabineno (Pietschmann *et al.*, 1998), β -cariofileno, germacrene D (Jesus *et al.*, 2016), cariofileno (Nascimento *et al.*, 2008), óxido de cariofileno (Jesus *et al.*, 2016), epóxido de humuleno (Koba *et al.*, 2007), calamusenona (Feitosa-Alcantara *et al.*, 2017).

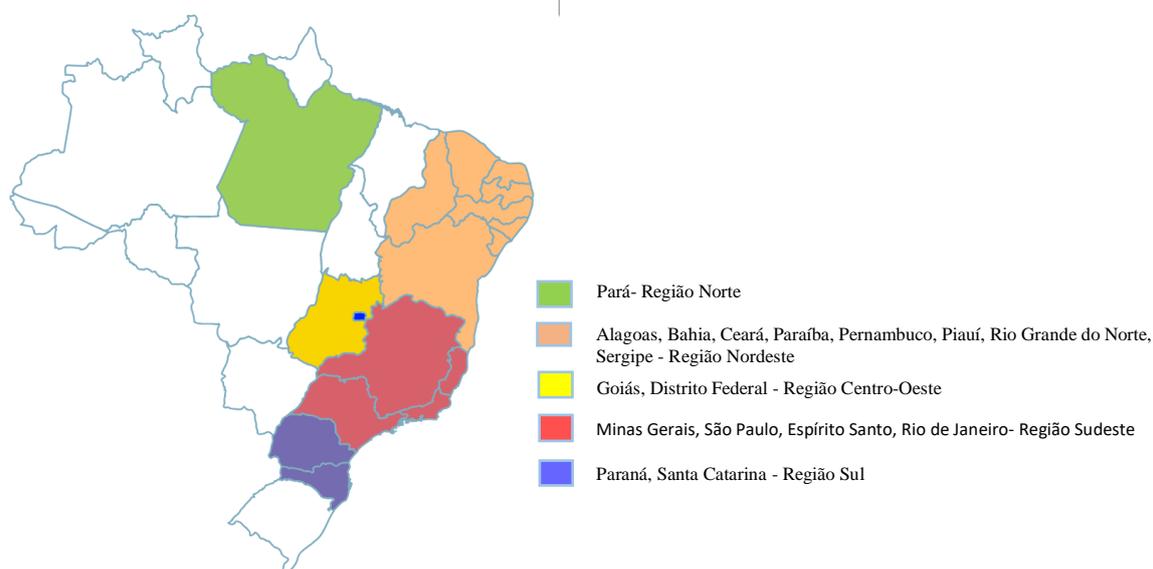


Figura 1.9 - Distribuição geográfica de *Hyptis pectinata* no Brasil. Há ocorrências confirmadas no Pará, Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe, Distrito Federal, Goiás, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Fonte: Antar, G.M. *Mesosphaerum in Flora do Brasil 2020* em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.ibri.gov.br/reflora/floradobrasil/FB59379>>. Acesso em: 15 Nov. 2018

1.3.3 Espécie *Hyptis suaveolens* Poit.

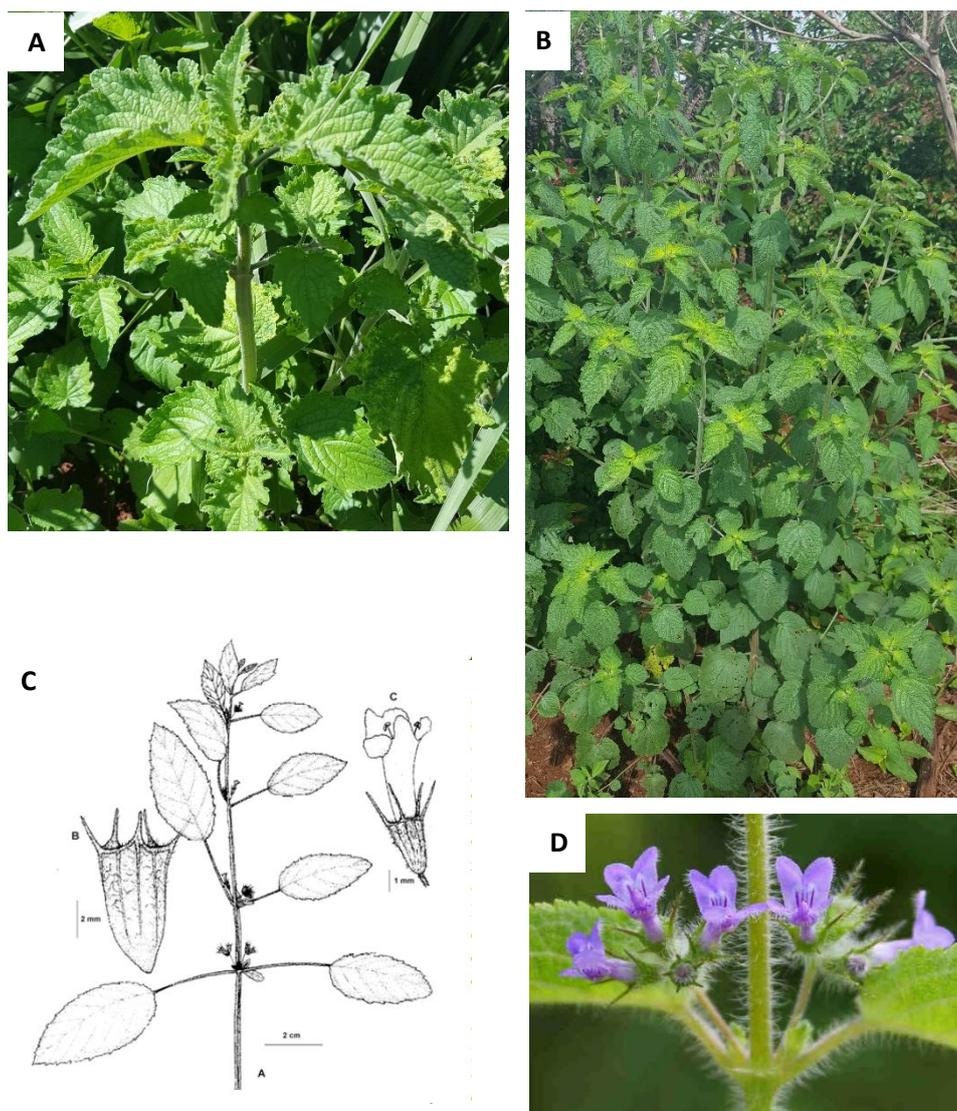


Figura 1.10 – Arbusto de *Hyptis suaveolens* Poit. adulto *in situ* (A e B), desenho representativo do ramo florido, do cálice e da flor isolada (C), Planta em floração (D). Fonte: (A e B) Elaborada pela própria autora, Rio Verde, Brasil, 2018; C) Basílio *et al.*, 2006; D) Disponível em: <https://garden.org/plants/view/92611/Wild-Spikenard-Hyptis-suaveolens/>. Acesso em 15/11/2018.

A espécie *Hyptis suaveolens* Poit. (Figura 1.10), conhecida popularmente como bamburral, sambacoité, mentrasto-do-grande, cheirosa, alfavacão, alfavaca-de-caboclo, alfazema-de-caboclo, alfazema-brava, salva-limão, betônica-brava, metrastograçú, são-pedro-caá, melissa-de-pson, pataquera, betônia-branca e chá-de-frança, é uma erva anual amplamente distribuída por regiões tropicais e subtropicais (Shenoy *et al.*, 2009). Esta dicotiledônea é nativa da América tropical, ocupa estradas, ferrovias, terrenos baldios, cursos de água, pastagens e florestas abertas onde o solo é bem drenado e pode formar matas densas em todas as áreas de crescimento (Sharma *et al.*, 2013). No Brasil, apresenta

ampla distribuição geográfica (Figura 1.11) ocorrendo com maior frequência nas regiões do cerrado, em áreas de cultivo de soja, onde pode atingir altas densidades populacionais (Gravena *et al.*, 2002).



Figura 1.11 - Distribuição geográfica de *Hyptis suaveolens* no Brasil. Há ocorrências confirmadas no Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná. Fonte: Antar, G.M. *Mesosphaerum in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB59418>>. Acesso em: 15 Nov. 2018

A espécie *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. apresenta-se como um subarbusto anual, ramificado, caule quadrangular e filotaxia oposta. Basílio e colaboradores (2006), descreveram morfológicamente a planta como sendo:

“Subarbusto anual, ereto, ramificado, até 1 m de altura; caule e ramos quadrangulares, verdes a cinéreos. Folhas opostas, lâmina 4,0-8,0 x 3,0-5,5 cm, oval ou subcordada, ápice agudo, base obtusa ou levemente cordada, margem serrada; pecíolo subquadrangular, canaliculado, 3,0-8,0 cm de comprimento. Inflorescências paucifloras, 10-20-flores, em subumbelas axilares, ráquis curta, 0,7-1,5 cm de comprimento. Flores sub-sésseis a curto-pediceladas, ca. 1,0 mm, protegidas por brácteas foliáceas, filiformes, ca. 1,0 mm de comprimento. Cálice 4-5 mm, tubuloso, glandular-pubescente, 5-lacinios, 1-2 mm, acrescente no fruto, iguais ou subiguais. Corola bilabiada: lábio superior levemente bifido, lábio inferior 3-laciniado, glabrescente, lacínios laterais ovais, subiguais, e o mediano menor; 4-estames, anteras bitecas e rimosas. Fruto 3,0-4,0 mm, esquizocárpico, separando-se em quatro núculas, soldadas duas a duas, acuminadas, glabras.”

H. suaveolens é considerada uma planta aromática, cujo aroma é geralmente secretado por certas estruturas das plantas, como os tricomas glandulares presentes nas nervuras e na superfície abaxial e adaxial das folhas (Chatri *et al.*, 2018). Esses tricomas são do tipo peltados e do tipo capitados I e II (Chatri *et al.*, 2018) e estão envolvidos com a secreção e acúmulo de vários metabólitos secundários

que conferem à planta características aromáticas e medicinais. Entre estes metabólitos, destacamos o óleo essencial (composto principalmente por terpenoides) útil aos seres humanos para a fabricação de pesticidas, drogas, condimentos e perfumes.

COMPOSTOS	REFERÊNCIAS
Monoterpenos Oxigenados	
1,8-cineol, fenchona	Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015; Tesh <i>et al.</i> , 2015
fenchol	Grassi <i>et al.</i> , 2005
hidrato de cis-sabineno e hidrato de trans-sabineno	Rana <i>et al.</i> , 2004
cânfora	Joy <i>et al.</i> , 2008
Terpinen-4-ol	Kossouh <i>et al.</i> , 2010
Eucaliptol	Moreira <i>et al.</i> , 2010a
Monoterpenos Hidrogenados	
α -pineno, terpinoleno, p -cimeno, α -terpineno	Eshilokun <i>et al.</i> , 2005
β -pineno, α -felandreno,	Taffurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015
α -terpinoleno	Grassi <i>et al.</i> , 2005
p -cimeno-8-ol	Rana <i>et al.</i> , 2004
γ -terpineno, mirceno	Ahmed <i>et al.</i> , 1994
β -felandreno	Martins <i>et al.</i> , 2007
sabineno	Bezerra <i>et al.</i> , 2017
Sesquiterpenos Oxigenados	
Cariofileno	Xu <i>et al.</i> , 2013
Óxido de cariofileno e (z)-trans- α -bergamotol	Kossouh <i>et al.</i> , 2010
espatulenol	Bezerra <i>et al.</i> , 2017
Globulol, α -cadinol	Martins <i>et al.</i> , 2007
Sesquiterpenos Hidrogenados	
β -cariofileno	Bezerra <i>et al.</i> , 2017
germacreno	Moreira <i>et al.</i> , 2010a
germacreno B	Ahmed <i>et al.</i> , 1994
germacreno D, E-cariofileno	Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015
biciclogermacreno	Tesh <i>et al.</i> , 2015
α -humuleno, <i>allo</i> -aromadendreno	Joy <i>et al.</i> , 2008
γ -elemeno, trans- β -cariofileno	Moreira <i>et al.</i> , 2010a
trans- α -bergamoteno	Kossouh <i>et al.</i> , 2010
cis- α -bergamoteno	Ngassoum <i>et al.</i> , 1999
Diterpenos	
hidrocarbono II	Tonzibo <i>et al.</i> , 2009
abietatrieno	Zellner <i>et al.</i> , 2009
abietadieno	Rana <i>et al.</i> , 2004
dehidroabietol	Martins <i>et al.</i> , 2007

Tabela 1.1 – Compostos majoritários encontrados em óleos essenciais de *Hyptis suaveolens*. Fonte: Elaborada pela própria autora, 2018.

Muitos estudos sobre a composição química dos óleos essenciais de *Hyptis suaveolens* revelam diferenças na composição química e no teor dos seus constituintes majoritários, evidenciando mecanismos de regulação dependentes de variações nas condições ambientais e endógenas (Martins *et*

al., 2006; Rodrigues *et al.*, 2012). Os óleos essenciais são constituídos por monoterpenos oxigenados e hidrogenados, sesquiterpenos oxigenados e hidrogenados e diterpenos (Tabela 1.1)

As folhas, hastes e inflorescências são muito utilizadas na medicina popular para tratamento de febre, dor de cabeça, reumatismo (Xu *et al.*, 2013), infecções respiratórias, dores gastrointestinais, indigestão, resfriado, cólicas, doenças de pele e câimbras (Moreira *et al.*, 2010a; Goly *et al.*, 2015; Chukwujekw *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2017a), asma, malária (Joy *et al.*, 2008), câncer e inflamação (Mandal *et al.*, 2007; Shenoy *et al.*, 2009; Ghaffari *et al.*, 2014; Grassi *et al.*, 2006; Shirwaikar *et al.*, 2003; Nayak *et al.*, 2014; Khonkarn *et al.*, 2015). Já no meio científico, este óleo essencial tem sido avaliado quanto a sua ação antibacteriana (Goly *et al.*, 2015), antifúngica (Muthamil *et al.*, 2018), antiplasmodial (Chukwujekwu *et al.*, 2005), antivirótica (Kothandan e Swaminathan, 2014), neuroprotetora (Ghaffari *et al.*, 2014), hepaprotetora (Ghaffari *et al.*, 2012), gastroprotetora (Jesus *et al.*, 2013), anti-inflamatória (Grassi *et al.*, 2006), antidiabética (Begum *et al.*, 2016a), inseticida (Hari e Mathew, 2018), repelente (Vongsombath *et al.*, 2012).

1.4 RADICAIS LIVRES, STRESS OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES

Consideram-se espécies reativas ou radicais livres os subprodutos metabólicos gerados continuamente em sistemas biológicos, sendo elementos essenciais ao corpo humano (Arul Ananth *et al.*, 2013). Sua formação está caracterizada como um conjunto de moléculas químicas altamente reativas por possuir um número ímpar de elétrons, muito instáveis e, portanto, capazes de doar ou retirar um elétron de outra molécula para obter estabilidade (Ayla e Ogun, 2015). Essas espécies reativas compreendem espécies radicalares ou não radicalares derivadas tanto do oxigênio (espécies reativas de oxigênio – EROs) como do nitrogênio (espécies reativas de nitrogênio - ERNs) (Silva, 2012) (Tabela 1.2).

Há duas possíveis formas de geração de EROs/ERNs: de forma endógena durante o metabolismo oxidativo mitocondrial, ou de forma exógena como na resposta celular a xenobióticos, citocinas e invasão bacteriana (Ray *et al.*, 2012). Embora EROs/ERNs exerçam efeitos benéficos para o organismo atuando como moléculas sinalizadoras na regulação de processos biológicos e fisiológicos (Schieber e Chandel, 2014), a produção destes também ocasiona efeitos deletérios pela oxidação de moléculas biologicamente essenciais, como lipídios, proteínas, carboidratos e DNA (Ray *et al.*, 2012). Assim, a manutenção da

homeostase no organismo torna-se dependente de um equilíbrio entre a geração de compostos oxidativos (EROs/ERNs) e sua neutralização por sistemas de defesa antioxidantes.

	EROs	ERNs
Radicais	Superoxido ($O_2\cdot^-$) Hidroxila ($OH\cdot$) Peroxila ($RO_2\cdot$) Alquoxila ($RO\cdot$) Hidroperoxila ($HO_2\cdot$)	Óxido nítrico ($NO\cdot$) Dióxido de nitrogênio ($NO_2\cdot$)
Não-Radicais	Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) Ácido hipocloroso ($HOCl$) Ozônio (O_3) Oxigênio singleto (1O_2)	Peroxinitrito ($ONOO$) Peroxinitrito de alquila ($ROONO$) Trióxido de dinitrogênio (N_2O_3) Tetróxido de dinitrogênio (N_2O_4) Ácido nitroso (HNO_2) Ânion de nitrônio (NO_2^-) Ânion nitroxil (NO^-) Cátion nitroso (NO^+) Cloreto de nitrito (NO_2Cl)

Tabela 1.2 - Diferentes tipos de EROs e ERNs produzidos nas células (adaptado de Dhawan, 2014).

Situações de desequilíbrios em resposta a uma variedade de estressores podem surgir e caracterizar o estresse oxidativo, com a produção excessiva de EROs ou deficiência das defesas antioxidantes da célula. Dentre possíveis estressores, comumente citam-se poluentes químicos, fumaça de cigarros, ingestão de gordura e carboidratos além de estresse físico e mental (Fisher-Wellman *et al.*, 2009). Este desequilíbrio é prejudicial aos componentes celulares e, portanto, ao organismo, ao favorecer a ocorrência de uma gama de patologias, como câncer, aterosclerose, artrite, lesão do sistema nervoso central e distúrbios degenerativos (Birben *et al.*, 2012).

O organismo humano pode se utilizar basicamente de dois mecanismos na tentativa de conter o estresse oxidativo: um deles seria a produção natural *in situ* de antioxidantes, os exógenos, e a outra forma, seria utilizar antioxidantes fornecidos externamente por meio de alimentos e/ou suplementos, os exógenos (Pham-Huy e He, 2008). Os antioxidantes, também, podem estar contidos em uma diversidade de cosméticos, medicamentos, plásticos e borrachas (Ito e Hirose, 1989).

Genericamente, Halliwell e Gutteridge (1990) definem antioxidantes como qualquer substância que atrasa, previne ou remove dano oxidativo a uma molécula alvo. Eles podem ser divididos (Tabela 1.3), conforme sua origem, em sintéticos, com grande aplicação na indústria alimentícia tais como o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), propil galato (PG) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ), ou naturais, como tocoferóis, os ácidos fenólicos e os extratos de plantas (Ito e Hirose, 1989; Ramalho e Jorge, 2006). Estes últimos são sintetizados no organismo humano por processo metabólico ou

adquiridos por meio de outras fontes naturais podendo ainda serem divididos em enzimáticos e não enzimáticos (Mamta *et al.*, 2013).

Os antioxidantes enzimáticos são produzidos apenas no organismo humano e podem ser: *primários* ao inibir ou retardar a oxidação por inativação de radicais livres pela doação de átomos de hidrogênio ou de elétrons transformando os radicais em substâncias estáveis; ou *secundários* podendo apresentar ligação de íons metálicos, inativação de EROs, conversão de hidroperóxidos em espécies não-radicalares ou absorção de radiação UV (Maisuthisakul *et al.*, 2007).

Os não enzimáticos são de origem externa ao organismo humano e fundamentais ao bom funcionamento metabólico (Raygani *et al.*, 2007). Entre eles, temos os minerais, vitaminas, carotenóides, polifenóis e outros mais.

NATURAL	Enzimático	Primários: <i>SOD, catalase, glutathione peroxidase</i>		
		Secundários: <i>glutathione reductase, glucose-6-fosfato desidrogenase</i>		
	Não-enzimático	Minerais: <i>Zinco, Selênio, Manganês, Ferro, Cobre</i>		
		Vitaminas: <i>A, C, E e K</i>		
		Carotenóides: <i>B-caroteno, licopeno, luteína, zeaxanthin</i>		
		Compostos organosulfurados: <i>allium, allyl sulfide, indoles</i>		
		Antioxidante de baixo peso molecular: <i>Glutathione, ácido úrico</i>		
		Cofatores antioxidantes: <i>Coenzimas Q₁₀</i>		
		Flavonóides	Flavonóis: <i>quercetina, kaempferol</i>	
			Isoflavanóides: <i>genisteína</i>	
			Flavanóis: <i>catequina, EGCG</i>	
			Antocianidinas: <i>cianeto, pelagoidina</i>	
			Flavanonas: <i>hesperitrina</i>	
			Flavonas: <i>crisina</i>	
		Polifenóis	Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxinâmicos: <i>ferrulico, p-cumárico</i>
Ácidos hidroxibenzóicos: <i>Ácido gálico, ácido elágico</i>				
Gingerol Curcumina				
SINTÉTICO	Compostos Polifenólicos	BHA BHT EDTA Etoxiquine		

Tabela 1.3 - Classificação dos antioxidantes (adaptado de Mamta *et al.*, 2013 e Ratnam *et al.*, 2006)

Tanto os antioxidantes naturais não-enzimáticos quanto os antioxidantes sintéticos apresentam-se como uma alternativa para prevenção à deterioração oxidativa dos alimentos e para minimizar os danos oxidativos nos seres humanos. Contudo, o emprego de antioxidantes sintéticos tem sido alvo de uma série de questionamentos quanto aos seus possíveis efeitos indesejáveis à saúde humana, dentre os quais se destaca sua ação carcinogênica (Del Ré e Jorge, 2012; Taghvaei e Jafari, 2015; Leão *et al.*,

2017). Como resultado, pesquisas encontram-se voltadas para a busca de compostos naturais, como os antioxidantes derivados de plantas, que exibam essa propriedade funcional.

1.5 OBJETIVOS GERAIS E SINOPSE DA TESE

O interesse por plantas medicinais, como uma terapia alternativa para tratar muitas doenças, tem aumentado significativamente em todo o Mundo (Dutra *et al.*, 2016). Porém, mesmo contando com aproximadamente 420.000 espécies de plantas no Planeta, até o momento, apenas um conhecimento muito limitado sobre elas está cientificamente disponível (Pan *et al.*, 2013).

O Brasil, por exemplo, é detentor de uma flora extremamente rica utilizada pela população para fins terapêuticos. Esta seria uma alternativa mais saudável por ser a base de fontes naturais, mais barata e de fácil acesso, sendo muitas das vezes, para alguns, a única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (Veiga Junior *et al.*, 2005). Todavia, por não envolverem rigoroso controle de qualidade quanto à segurança e eficácia, faltam trabalhos científicos que comprovem seu real efeito no tratamento das enfermidades e que alavanquem o modesto mercado brasileiro de fitomedicamentos que representa menos de 5% de todos os medicamentos comercializados (Dutra *et al.*, 2016). Portanto, é preciso investir em estudos sobre segurança (toxicologia), farmacocinética e, especialmente, em ensaios científicos pré-clínicos ou clínicos (Veiga Junior *et al.*, 2005; Dutra *et al.*, 2016).

O objetivo desta Tese foi avaliar a atividade antimicrobiana, antioxidante, citotóxica, hepatoprotetora e anti-inflamatória *in vitro* de extratos de folhas de *Hyptis marrubioides*, *Hyptis pectinata* e *Hyptis suaveolens* oriundas do cerrado brasileiro, bem como determinar seu perfil fitoquímico. Além disso, culturas de células em suspensão destas espécies foram estabelecidas, eliciadas com estressores bióticos e abióticos e avaliadas quanto a produção de ácido rosmarínico.

Esta tese de doutoramento está organizada em 8 capítulos principais e, além da Introdução Geral (Capítulo 1), uma breve descrição de cada um dos capítulos é dada abaixo.

O Capítulo 2 explora a composição química, atividades farmacológicas, toxicidade e uso alimentar do gênero *Hyptis* com ênfase as espécies Hm, Hp e Hs por meio de uma revisão sistemática.

O Capítulo 3 descreve o estabelecimento de plântulas, calos e células em suspensão de Hm, Hp e Hs para avaliação dos metabólitos secundários. As culturas de células em suspensão de Hm e Hs

foram eliciadas com três diferentes tipos de estressores: metil jasmonado, ácido salicílico e extrato de levedura. Os efeitos da eliciação sobre a produção de metabólitos secundários foram avaliados.

O Capítulo 4 avalia o perfil fitoquímico e a atividade antioxidante dos extratos metanólicos de folhas de Hm, Hp e Hs cultivadas *in vivo* e *in vitro*. Os métodos espectrofotométricos utilizados foram DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil), capacidade de sequestro do ânion superóxido, inibição da oxidação de β -caroteno/ácido linoleico, capacidade de quelação do ferro, capacidade de inibição da produção do óxido nítrico, poder antioxidante de redução dos íons ferro.

O Capítulo 5 aborda o potencial antibacteriano dos extratos metanólicos, de acetato de etila e de diclorometano de folhas *in vivo* de Hm, Hp e Hs frente às cepas *S. aureus* (ATCC® 25923™), *S. aureus* (ATCC® 29213™), *E. coli* (ATCC® 10536™), *E. coli* (ATCC® 25922™), *S. Choleraesuis* (ATCC® 10708™), *S. Typhimurium* (ATCC® 13311™).

No Capítulo 6 são investigados os efeitos citotóxicos e hepatoprotetores de extratos metanólicos de Hm, Hp e Hs em células de linhagem hepática humana HepG₂. Também se avaliou os níveis de EROs intracelular e a atividade anti-inflamatória dos extratos.

O Capítulo 7 compreende as principais conclusões gerais que podem ser obtidas do trabalho apresentado nesta tese.

O Capítulo 8 traz todas as referências bibliográficas abordadas nesta Tese.

Capítulo 2

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS, TOXICIDADE E USO ALIMENTAR DE *Hyptis* spp.: REVISÃO SISTEMÁTICA

2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS, TOXICIDADE E USO ALIMENTAR DE *Hyptis* spp.: REVISÃO SISTEMÁTICA

2.1 INTRODUÇÃO

Algumas plantas têm despertado interesse em todo mundo, particularmente as da família Lamiaceae, por possuírem propriedade medicinais (Zellner *et al.*, 2009), servirem de condimentos na culinária (Falcão e Menezes, 2003) e por apresentarem grande variedade de metabólitos secundários, como terpenoides, lactonas, lignanas, ácidos graxos, flavonoides e compostos fenólicos (Darias *et al.*, 1990; Konuklugil, 1996; Rios *et al.*, 2002; Patora e Klimek, 2002; Azcan *et al.*, 2004; Rehan *et al.*, 2014; Padilla-Gonzalez *et al.*, 2016). Esta família, de distribuição cosmopolita, é pertencente à Ordem Tubiflorae (Lamiales), abrangendo cerca de 236 gêneros e 7173 espécies conhecidas (Harley *et al.*, 2004), entre os quais se encontra o gênero *Hyptis* Jacq..

Hyptis é uma palavra que vem do grego “hyptios” (retroflexo) em alusão ao lobo mediano do lábio inferior da corola, em forma de saco, articulado na base, que se torna deflexo após a polinização (Falcão, 2003). Esse gênero, membro da tribo Ocimeae e subtribo Hyptidinae, é um dos maiores da família Lamiaceae com aproximadamente 400 espécies (Facey *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2011a e b; Sakr *et al.*, 2013; Barbosa *et al.*, 2013; Bachheti *et al.*, 2015). Estas espécies apresentam-se na forma de arbustos, subarbustos ou ervas perenes ou anuais, fortemente aromáticos ou odoríferos, com distribuição nas regiões tropicais e subtropicais (Silva-Luz *et al.*, 2012), principalmente Américas, mas também encontradas na África, Índia, sudeste Asiático e Austrália (Flores *et al.*, 2014). No Brasil, verifica-se ampla diversidade morfológica na região do cerrado brasileiro onde os solos são ácidos, pobres em nutrientes e ricos em alumínio. Suas flores são esternotribicas, cujos os estames são mantidos no lábio inferior da corola e na maioria das espécies é fortemente comprimido para formar um explosivo mecanismo de polinização (Harley, 1988).

“O gênero *Hyptis* se caracteriza por apresentar folhas decussadas ou não, pecioladas ou sésseis, discolores ou concolores, diversos padrões de venação, geralmente coriáceas ou

cartáceas até membranáceas, normalmente indumentadas. Inflorescência: geralmente capítulos hemisféricos, às vezes esféricos, bractéolas involucreais persistentes. Flor: cálice campanulado ou tubular, subactinomorfo, 5-lobado, os lobos iguais ou subiguais, elípticos, estreitamente elípticos, lanceolados, lineares ou triangulares, subulados ou planos, com ou sem apêndice conspicuo expandido e complanado, persistente no fruto, com tubo acrescente, proeminentemente 10-nervado, reticulado, face interna geralmente glabra, face externa esparsamente ou densamente indumentada, tricomas tectores ou glandulares; corola fortemente 2-labiada, 5-lobada (2/3), tubulosa, alva, lilás, rosa, roxa ou roxo-azulada, com lobo posterior manchado; estames 4, exsertos do tubo, filetes indumentados ou glabros; ovário 4-lobado, estilete ginobásico, geralmente articulado acima do ovário, a porção basal, estilopódio persistente. Fruto com 4 núculas, geralmente complanadas, glabras ou tomentosas, lenticeladas, lisas ou verruculosas. (Silva-Luz *et al.*, 2012),”

Os metabólitos secundários de plantas do gênero *Hyptis* são conhecidos por sua utilidade medicinal e são usados na medicina popular para tratar uma série de enfermidades, tais como doenças de pele, distúrbios gástricos, conjuntivite, febre (Barbosa e Ramos, 1992; Sakr *et al.*, 2013), rinofaringite, congestão nasal (Malan *et al.*, 1988), inflamações, infecções bacterianas, dor e câncer (Bispo *et al.*, 2001).

A espécie *Hyptis suaveolens* Poit. conhecida por “alfazema, bamburral, mastranto, macusa” é considerada uma erva daninha desagradável e é muito citada na literatura quanto a usos tradicionais de países como Índia, Brasil, Tailândia e África. As folhas, ramos, hastes e inflorescências foram as partes mais aproveitadas para preparação de medicamentos naturais. Entre os vários problemas tratados por elas citam-se febre, dor de cabeça, reumatismo (Xu *et al.*, 2013), infecções respiratórias, dores gastrointestinais, indigestão, resfriado, cólicas, doenças de pele e câimbras (Moreira *et al.*, 2010a; Goly *et al.*, 2015; Chukwujekw *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2017a), asma, malária (Joy *et al.*, 2008), câncer e inflamação (Mandal *et al.*, 2007; Shenoy *et al.*, 2009; Ghaffari *et al.*, 2014; Grassi *et al.*, 2006; Shirwaikar *et al.*, 2003; Nayak *et al.*, 2014; Khonkarn *et al.*, 2015).

Quanto à espécie *Hyptis pectinata* Poit. conhecida por “sambacaitá ou canudinho”, destacam-se relatos no Brasil sobre o uso para tratamento de rinofaringite, congestão nasal, doenças de pele, distúrbios gástricos, febre, infecções bacterianas, inflamações de garganta, dor e câncer (Tchoumboungang *et al.*, 2005; Raymundo *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2008; Nascimento *et al.*, 2008; De Queiroz *et al.*, 2014). As folhas foram a parte mais aproveitada em usos tradicionais.

Já a espécie *Hyptis marruboides* Epling, conhecida por “hortelã do campo”, sobressai-se pelas suas atividades contra infecções gastrointestinais, infecções de pele, dores e câimbras (Botrel *et al.*, 2009).

Várias outras espécies de *Hyptis* apresentam efeito medicinal sendo que algumas dessas espécies e suas aplicações no uso popular podem ser verificadas na tabela 2.1.

Espécie	Nome popular	Uso etnobotânico	Referências
<i>H. albida</i>	Sálvia ou orégano (México)	Distúrbios gastrointestinais, infecções de pele, reumatismo, cólicas, dores musculares, gripe, ferida, diferentes parasitas e insetos (ação repelente).	Miranda <i>et al.</i> , 2013; Santos <i>et al.</i> , 2008; Camacho-Corona <i>et al.</i> , 2015; Pereda-Miranda, 1995.
<i>H. atrorubens</i> Poit.	Makouza, mentinha, hortelã-brava	Dermatite, inflamação, febre, reumatismo, problemas respiratórios, pé de atleta, dor de garganta e gripe.	Kerdudo <i>et al.</i> , 2016; Abedine <i>et al.</i> , 2013.
<i>H. brevipes</i> Poit.	Nanto-iganigakusa (Taiwan), genggeyan e kaneja (Indonésia), sawi hutan (Malásia), fazendeiro, hortelã-brava, alfavaca-do-mato (Brasil)	Asma, malária, insetos (ação repelente), infecções gastro-intestinais, câibras, dor e infecções de pele.	Xu <i>et al.</i> , 2013; Bhuiyan <i>et al.</i> , 2010; Correa, 1931.
<i>H. carpinifolia</i> Benth.	Rosmaninho e mata-pasto	Resfriados, gripes e reumatismo.	Rodrigues e Carvalho, 2001; Brandão <i>et al.</i> , 2012
<i>H. fasciculata</i> Benth.	-	Gota, espasmos, secreções na via respiratória, febre, secreções nos brônquios e escarro.	Silva <i>et al.</i> , 2009; Isobe <i>et al.</i> , 2006.
<i>H. fruticosa</i> Salzm. ex Benth.	Alecrim de tabuleiro, alecrim de vaqueiro	Dores (analgésico), inflamação, convulsões.	Menezes <i>et al.</i> , 2007; Franco <i>et al.</i> , 2011b.
<i>H. lanceolata</i> Poir.	-	Infecções do trato respiratório.	Tchoumboungang <i>et al.</i> , 2005.
<i>H. martiusii</i> Benth	Bálsamo louco, cidreira brava ou cidreira do mato	Doenças intestinais e estomacais, úlceras, microrganismos, tumores e insetos (ação inseticida).	Coutinho <i>et al.</i> , 2008; Barbosa <i>et al.</i> , 2017
<i>H. mutabilis</i> (Rich.) Brinq.	Alfavaca, sambacuité, alfavaca-de-caboclo, sambaité, bamburral e manjerição e albahaquila	Dores gastrointestinais, gastrite, malária, dor de cabeça, secreções nos brônquios. Usado como sedativo.	Oliva <i>et al.</i> , 2006; Grassi <i>et al.</i> , 2006; Silva <i>et al.</i> , 2013a.
<i>H. plectranthoides</i> Benth.	Bertonica	Distúrbios do estômago.	Brandão <i>et al.</i> , 2012
<i>H. rhomboidea</i> Mart. Gal.	Diao qiu cao (chinês), knobweed (inglês), vao mini, vao mini (Samoano)	Febre, dor de cabeça, inchaço, desordem gastrointestinal, hepatite, reumatismo, úlcera, dermatite e eczema.	Li <i>et al.</i> , 2014; Xu <i>et al.</i> , 2013.
<i>H. spicigera</i> Lam.	Gergelim preto, guardião dos mosquitos	Usado para fazer sabonetes, loções, alimentos aromatizantes e como medicamentos.	Tchoumboungang <i>et al.</i> , 2005; Akobundu e Agyakwa, 1998.
<i>Hyptis verticillata</i> Jacq.	John Charles (Jamaica), erva de martina ou erva negra (México)	Secreções (adstringente), doenças de pele (eczema, psoríase, sarna e pé de atleta), gripe, desordens gastrointestinais.	Facey <i>et al.</i> , 2005; Kunth <i>et al.</i> , 1994; Pereda-Miranda, 1995.

Tabela 2.1 – Uso etnobotânico de plantas do gênero *Hyptis*.

Embora haja um grande número de espécies do gênero *Hyptis*, poucas investigações sobre as atividades biológicas e composição química foram realizadas. Também há pouca informação sobre a toxicologia o que se faz preocupante, uma vez que estas são usadas pela população local no tratamento de enfermidades e como alimento. O objetivo desta revisão foi, portanto, explorar a composição química, atividades farmacológicas, toxicidade e uso alimentar do gênero *Hyptis* para levantar informações que direcionem e justifiquem o prosseguimento de estudos sobre estas plantas.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta revisão sistemática, realizou-se uma busca por artigos que abordassem a composição química, toxicologia, uso alimentar e atividades farmacológicas de plantas do gênero *Hyptis*. Ela foi fundamentada nas diretrizes da declaração PRISMA (Principais Itens para Relatar Revisões Sistemáticas e Meta-Análises - <http://www.prisma-statement.org/>) buscando apresentar as informações de forma coerente para que pesquisadores possam avaliar e utilizar os resultados apontados.

Foram utilizadas as bases de dados da ScienceDirect® (<https://www.sciencedirect.com/>), PubMed® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), Scopus (<http://www.scopus.com>) e Scielo® (<http://www.scielo.org/php/index.php>). Selecionaram-se artigos por título, por abstract e por texto completo referente a aplicação etnobotânica e farmacológica de plantas do gênero *Hyptis*. A palavra “*Hyptis*” foi utilizada para critério de pesquisa na Scopus (título e/ou resumo= 360), Sciencedirect (título e/ou resumo e/ou palavra-chave=127), Scielo (título e/ou resumo=93), Pubmed (título e/ou resumo e/ou palavra-chave=199). Os artigos relatando atividades biológicas e composição química de extratos, óleos essenciais, compostos isolados e biomassa de plantas *Hyptis* spp. foram incluídos nesta revisão. Já os artigos que não foram encontrados na íntegra, ou eram de revisão, ou de comunicação curta ou publicados em língua chinesa, ou versavam sobre assuntos contrários a atividade biológica e composição química, foram excluídos.

Num primeiro momento foram selecionados artigos de bases de dados usando os critérios de pesquisa descritos acima. Destes, excluíram-se os duplicados. Os artigos restantes seguiram para fase da triagem onde foram incluídos ou excluídos por “título” e depois por “resumo”. A seguir, os artigos incluídos por título e resumo e que apresentaram texto completo foram direcionados para fase de elegibilidade. Durante esta fase, os artigos foram cuidadosamente analisados. Aqueles que não preenchiam os critérios de inclusão foram excluídos. Já os que se adequavam à busca foram então utilizados para compor esta revisão sistemática.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Busca na literatura

As pesquisas abrangeram artigos com publicação até março de 2018. Foram incluídos 238 artigos, sendo que 101 destes versam sobre a espécie *Hyptis suaveolens*, 30 sobre *Hyptis pectinata*, 10 sobre *Hyptis marrubioides* e 112 sobre outras espécies (Figura 2.1).

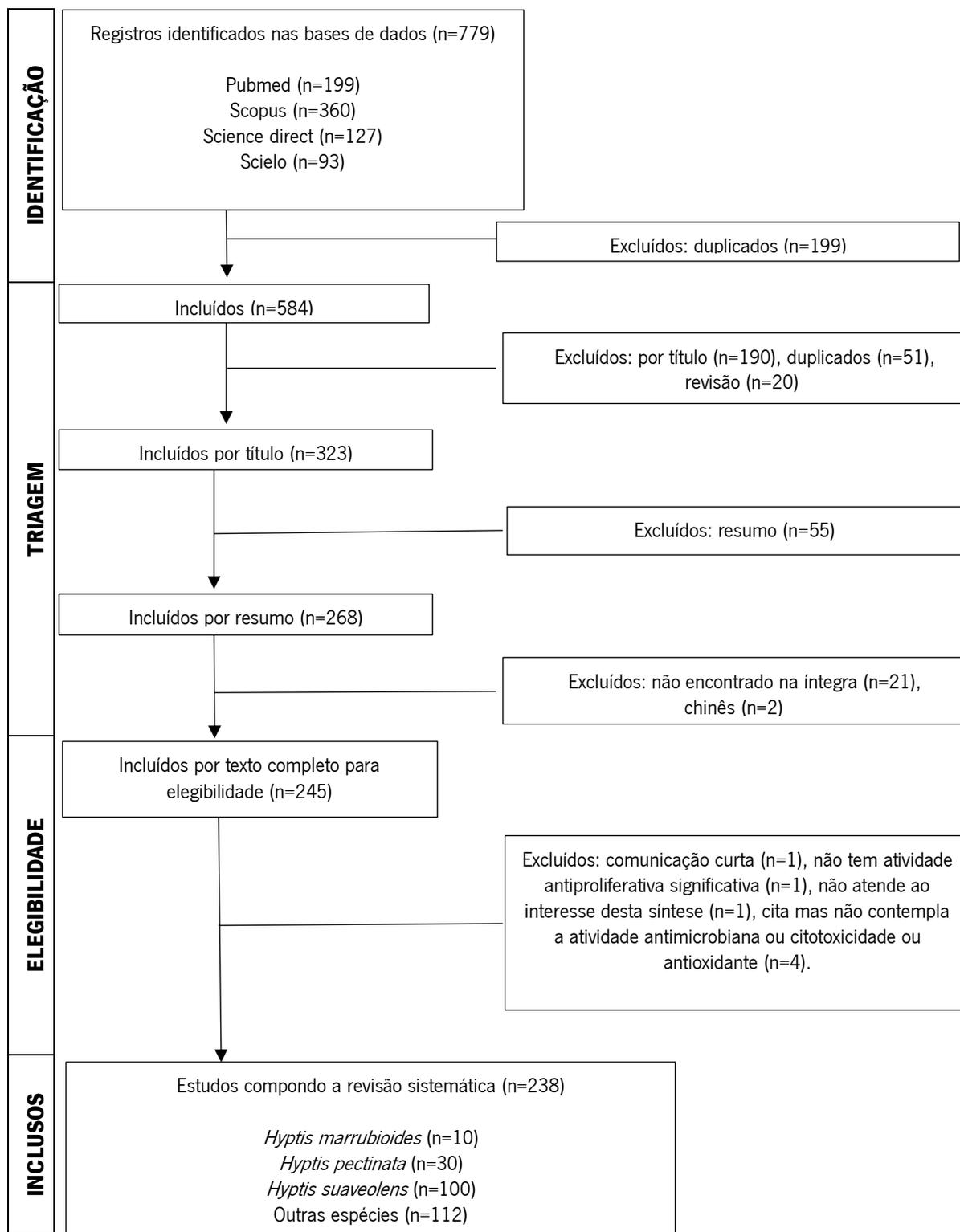


Figura 2.1 –Diagrama de fluxo de identificação do estudo com inclusões e exclusões

Constataram-se estudos com 40 espécies de *Hyptis*. Nestes estudos, 25 espécies foram avaliadas quanto a composição química (CQ), 30 quanto a atividades biológicas (AB), 05 quanto a toxicologia (TO), 01 quanto a alimentação (AL). Das espécies relatadas temos *H. albida* (AB), *H. atrorubens* (AB), *H. brepives* (CQ, AB, TO), *H. brachita* (CQ), *H. campestres* (AB), *H. capitata* (AB), *H. carpinifolia* (CQ), *H. crenata* (CQ, AB), *H. conferta* (CQ), *H. comaroides* (AB), *H. colombiana* (CQ, AB), *H. dilata* (CQ), *H. emoryi* (CQ), *H. fasciculata* (AB), *H. fruticosa* (CQ, AB, TO), *H. floribunda* (CQ), *H. glomerata* (CQ), *H. incana* (AB), *H. lacustres* (AB), *H. lanceolata* (CQ), *H. lantanifolia* (AB), *H. lappulacea* (AB), *H. macrostachys* (AB), *H. marrubioides* (CQ, AB), *H. martiusii* (CQ, AB), *H. meridionalis* (AB), *H. multibractea* (AB), *H. mutabilis* (CQ, AB), *H. ovalifolia* (CQ, AB), *H. passerina* (CQ, AB); *H. pectinata* (CQ, AB, TO), *H. radicans* (AB), *H. recurvata* (CQ), *H. rhomboidea* (CQ, AB, TO), *H. spicigera* (CQ, AB), *H. suaveolens* (CQ, AB, TO, AL), *H. umbrosa* (AB), *H. villosa* (CQ), *H. velutina* (CQ, AB), *H. verticillata* (CQ, AB).

A espécie *Hyptis suaveolens* teve o maior número de citações, com expressivo número de estudos sobre composição química e atividades biológicas. A atividade antimicrobiana e inseticida foram as mais testadas, havendo também testes de toxicologia e artigos abordando seu valor alimentício.

Hyptis pectinata e *Hyptis marrubioides* tiveram poucos registros sobre composição química. Para atividade biológica de *Hyptis pectinata*, a maioria dos trabalhos ressaltavam sua atividade antimicrobiana, antinociceptiva e regeneração hepática. Já a espécie *Hyptis marrubioides* basicamente, atividade antimicrobiana.

Para outras espécies, há trabalhos quanto a composição química e atividade antimicrobiana, inseticida, antioxidante, citotoxicidade, antinociceptiva, anti-inflamatória e gastroproteção.

2.3.1.1 Composição química

Estudos sobre as espécies *Hyptis* têm se preocupado com a caracterização dos compostos químicos presentes em extratos ou óleos essenciais de sementes, folhas, inflorescências, hastes, partes aéreas e planta inteira. Conforme Falcão e Menezes (2003), há compostos pertencentes a uma ampla classe de metabólitos, formados a partir da via do ácido acético, da via do ácido chiquímico e de via biossintética mista. São representantes da classe dos sesquiterpenos, triterpenos, diterpenos, monoterpenos, lignanas, alcaloides, flavonoides e polifenóis.

2.3.1.1.1 Principais fitoconstituintes dos extratos vegetais

Há poucos estudos sobre os fitoconstituintes de extratos de plantas *Hyptis*. Entre os fitoconstituintes descritos, destaca-se a presença do polifenol ácido rosmarínico nas espécies *H. verticillata* e *H. pectinata* (Tabela 2.2). O ácido rosmarínico contribuiu para os efeitos antibacterianos de *H. verticillata* e mostrou efeitos significativos na estabilização de capilares em ensaios anti-inflamatórios (Kuhnt *et al.*, 1995).

Outros fitoconstituintes identificados em *H. verticillata* foram a desidropodofilotoxina e a sideritoflavona. O primeiro, segundo Kuhnt e colaboradores (1995), exibiu efeito antibacteriano enquanto que o segundo inibiu a prostaglandina sintase de forma significativa e teve efeitos antisecretórios comparáveis aos da NPPB (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoate) .

Em *H. pectinata* foram identificadas três pironas (pectinólidos D, E e F) e uma 2(5H)-furanona (pectinólido G) (Boalino *et al.*, 2003). Falcao e colaboradores (2013) ressaltaram a descoberta de dois novos compostos (ácido sambacaitarico e ácido 3-O-metil-sambacaitarico) a partir de análogos do ácido rosmarínico e flavonoides isolados de *H. pectinata*. Entre os fitoconstituintes, Kuhnt e colaboradores (1994), apontaram a presença de muitas lignanas. Entre estas, destacou-se a presença de hyptinina isolada de *H. verticillata* e identificada pela primeira vez (Kuhnt *et al.*, 1994).

Tabela 2.2 – Fitoconstituintes de extratos de plantas do gênero *Hyptis*.

Composto	Espécie	Parte	Extrato	País - Autor
Sideriloflavona; Podofilotoxina; 4'-desmetilpodofilotoxina; Dehidropodopillotoxina; Desidrodexoxipodofilotoxina; Hidinina; Odorhizol; epipodorhizol	<i>H. verticillata</i>	Partes aéreas	Etanólico	Alemanha – Kuhnt <i>et al.</i> , 1995
			Aquoso	Alemanha – Kuhnt <i>et al.</i> , 1995
			Éter	Alemanha – Kuhnt <i>et al.</i> , 1994
Ácido rosmarínico	<i>H. verticillata</i>	Partes aéreas	Etanólico	Alemanha – Kuhnt <i>et al.</i> , 1995
			Aquoso	Alemanha – Kuhnt <i>et al.</i> , 1995
			Éter	Alemanha – Kuhnt <i>et al.</i> , 1994
	<i>H. pectinata</i>	Folhas	Acetato de etila	Brasil– Falcao <i>et al.</i> , 2013
Ácido Sambacaitárico; Ácido 3-O-metil-sambacaitarico; ácido 3-O-metil-rosmarínico; Etil caffeoato; Nepetoidina A; Nepetoidina B; Cirsiliol; Circimaritina; 7-O-metil-luteolina; Genkwanina	<i>H. pectinata</i>	Folhas	Acetato de etila	Brasil– Falcao <i>et al.</i> , 2013
Pectinólidos D, E, F e G	<i>H. pectinata</i>	Partes aéreas	Diclorometano	Boalino <i>et al.</i> , 2003

2.3.1.1.2 Principais fitoconstituintes dos óleos essenciais

O óleo essencial da maioria das *Hyptis* (Tabela 2.3) apresentaram como composto majoritário o sesquiterpeno hidrogenado β -cariofileno (presente em 15 espécies). Tal situação não foi diferente para *H.marrubioides*, *H.pectinata* e *H.suaveolens*. Além deste composto, destacam-se também germacreno D (9 espécies), bicyclogermacreno (7 espécies) e germacreno B (3 espécies). No caso dos sesquiterpenos oxigenados, temos cariofileno óxido (6 espécies), E-cariofileno (4 espécies), globulol, espatulenol, cariofileno (com 3 espécies cada).

Já entre os monoterpenos hidrocarbonados, destacaram-se os β -pineno (9 espécies), α -pineno (7 espécies), limoneno (5 espécies), terpinoleno (4 espécies), sabineno (4 espécies), β -felandrene (3 espécies), δ -3-carene (3 espécies) enquanto que nos monoterpenos oxigenados tem-se, 1,8-cineole (8 espécies) e cânfora (5 espécies).

Os diterpenos como abietatrieno, abietadieno e dehidroabietol, além dos outros citados acima, se destacaram na espécie *H. suaveolens*. Esta espécie apresenta vários relatos sobre sua constituição química a partir de óleos extraídos de planta inteira, partes aéreas, folhas, inflorescências, hastes e frutos.

A grande variação nas características químicas dos constituintes ativos dos óleos tem sido notada em vários estudos, principalmente, para a espécie *H. suaveolens*. Alguns autores demonstraram que essas variações podem estar relacionadas a genética e tipos de clima e solo (Franco *et al.*, 2011a). Portanto, os locais e época de colheita se fazem importantes (Noudjou *et al.*, 2007; Tchoumbougang *et al.*, 2005) e a interação macronutrientes, fotoperíodo (Martins, *et al.*, 2006), as partes das plantas e a fase de desenvolvimento da planta (antes e depois da floração) interferem no teor e qualidade dos constituintes (Ngassoum *et al.*, 1999).

Botrel e colaboradores (2009) constataram que o teor e composição do óleo essencial de *H.marrubioides* variou para diferentes genótipos e para partes da planta fresca (inflorescência, folhas e caules). Já Azevedo e colaboradores (2002) indicaram os fatores latitudes e altitudes como responsáveis pela variabilidade dos fitoconstituintes dos óleos de *H.suaveolens* provenientes de 11 localidades da região do cerrado brasileiro.

Situações em que há diferenças importantes nos constituintes ativos de uma mesma população, podem caracterizar casos de polimorfismo químico (Azevedo *et al.*, 2002; Franco *et al.*, 2011a).

Tabela 2.3 – Fitoconstituintes químicos majoritários identificados em óleos essenciais de plantas do gênero *Hyptis*.

Monoterpenos oxigenados			
Composto	Espécie	Parte	País - Autor
1,8-cineol	<i>H. mutabilis</i>	Planta inteira	Colômbia - Zapata <i>et al.</i> , 2009; Brasil - Luz <i>et al.</i> , 1989
		Folhas e hastes	Brasil - Aguiar <i>et al.</i> , 2003
	<i>H. recurvata</i>	Folhas	Peru - Leclercq <i>et al.</i> , 2000
	<i>H. fruticosa</i>	Folhas	Brasil - Franco <i>et al.</i> , 2011b e a
		Flores	Brasil - Franco <i>et al.</i> , 2011b e a
		Sementes	Brasil - Franco <i>et al.</i> , 2011b
	<i>H. carpinifolia</i>	Folhas	Brasil - Sá <i>et al.</i> , 2016
	<i>H. martiusii</i>	Folhas	Brasil - Oliveira <i>et al.</i> , 2014a; Brasil - Barbosa <i>et al.</i> , 2017; Brasil - Araújo <i>et al.</i> , 2003
	<i>H. crenata</i>	Folhas e ramos	Brasil (Pará) - Zoghbi <i>et al.</i> , 2002
	<i>H. spicigera</i>	Flores	Camarões -Noudjou <i>et al.</i> , 2007
<i>H. suaveolens</i>	Folhas	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015; Costa do Marfim (Jacquville) – Tonzibo <i>et al.</i> , 2009; Nigéria -Eshilokun <i>et al.</i> , 2005; Darwin (Austrália) - Peerzada, 1997; Venezuela -Tesh <i>et al.</i> , 2015; Califórnia - Ahmed <i>et al.</i> , 1994	
		Flores	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015; Venezuela -Tesh <i>et al.</i> , 2015
	Partes aéreas	China -Xu <i>et al.</i> , 2013; Brasil -Azevedo <i>et al.</i> , 2002; Índia - Mallavarapu <i>et al.</i> , 1993; Brasil -Oliveira <i>et al.</i> , 2005; Índia -Lohani <i>et al.</i> , 2011; Brasil -Campos <i>et al.</i> , 2002	
	Folhas e inflorescências	El Salvador (norte) - Grassi <i>et al.</i> , 2005	
Fenchone	<i>H. mutabilis</i>	Planta inteira	Colômbia - Zapata <i>et al.</i> , 2009
	<i>H. suaveolens</i>	Folhas e inflorescências	El Salvador (sul) – Grassi <i>et al.</i> , 2005
		Folhas	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015; Venezuela -Tesh <i>et al.</i> , 2015
		Flores	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015; Venezuela -Tesh <i>et al.</i> , 2015
Fenchol	<i>H. suaveolens</i>	Folhas e inflorescências	El Salvador (sul) – Grassi <i>et al.</i> , 2005
Cis-sabineno hidratado e trans-sabino hidratado	<i>H. suaveolens</i>	Galhos em floração	Índia – Rana <i>et al.</i> , 2004
Borneol	<i>H. crenata</i>	Folhas e ramos	Brasil – Zoghbi <i>et al.</i> , 2002
Thymol	<i>H. mutabilis</i>	Folhas	Brasil (nordeste) - Luz <i>et al.</i> , 1989
		Folhas e hastes	Brasil (Amapá) - Aguiar <i>et al.</i> , 2003
Acetato de bornyl	<i>H. dilata</i>	Folhas	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015
		Flores	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015
Cânfora	<i>H. dilata</i>	Folhas	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015
		Flores	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015
	<i>H. martiusii</i>	Folhas	Brasil – Barbosa <i>et al.</i> , 2017
	<i>H. crenata</i>	Planta inteira	Brasil – Scramin <i>et al.</i> , 2000
	<i>H. mutabilis</i>	Partes aéreas	Argentina – Velasco-Negueruela <i>et al.</i> , 1995
<i>H. suaveolens</i>	Folhas	Índia – Joy <i>et al.</i> , 2008	
Cis-thujona	<i>H. marruboides</i>	Folhas	Brasil - Sales <i>et al.</i> , 2009
Trans-thujona	<i>H. marruboides</i>	Folhas (no campo)	Brasil - Botrel <i>et al.</i> , 2010b
Terpinen-4-ol	<i>H. suaveolens</i>	Folhas	Benin – Kossouh <i>et al.</i> , 2010; Nigéria -Eshilokun <i>et al.</i> , 2005; EUA - Ahmed <i>et al.</i> , 1994; Nigéria – Asekun e Ekundayo, 2000
		Frutos	Benin – Kossouh <i>et al.</i> , 2010
		Galhos em floração	Índia – Rana <i>et al.</i> , 2004
Eucaliptol	<i>H. suaveolens</i>	Folhas	Brasil – Moreira <i>et al.</i> , 2010a

Tabela 2.3 – Fitoconstituintes químicos majoritários identificados em plantas do gênero *Hyptis* (continuação)

Monoterpenos hidrocarbonados			
Composto	Espécie	Parte	País - Autor
α-thujona	<i>H. marruboides</i>	Folhas	Brasil - Botrel <i>et al.</i> , 2010a
		Flor (genótipo roxo)	Brasil - Botrel <i>et al.</i> , 2009
		Folha (genótipo roxo)	Brasil - Botrel <i>et al.</i> , 2009
β-thujona	<i>H. marruboides</i>	Folhas	Brasil - Botrel <i>et al.</i> , 2010a
		Flor (genótipo roxo)	Brasil - Botrel <i>et al.</i> , 2009
α-pineno	<i>H. spicigera</i>	Planta inteira	Mali – Sidibé <i>et al.</i> , 2001
		Folhas	Camarões - Tchoumboungang <i>et al.</i> , 2005; Burkina Faso – Kini <i>et al.</i> , 1993;
		Inflorescências	Burkina Faso – Kini <i>et al.</i> , 1993; Camarões – Noudjou <i>et al.</i> , 2007
	<i>H. fruticosa</i>	Folhas	Brasil – Franco <i>et al.</i> , 2011 a e b;
		Flores	Brasil – Franco <i>et al.</i> , 2011 a e b;
	<i>H. crenata</i>	Folhas e ramos	Brasil (Pará) - Zoghbi <i>et al.</i> , 2002
		Planta inteira	Brasil – Scramin <i>et al.</i> , 2000
	<i>H. martiusii</i>	Inflorescências	Brasil - Araújo <i>et al.</i> , 2003
	<i>H. emoryi</i>	Inflorescência	EUA – Tucker <i>et al.</i> , 2005
	<i>H. mutabilis</i>	Planta Inteira	Brasil (Mato Grosso) – Luz <i>et al.</i> , 1989
<i>H. passerina</i>	Flores	Brasil – Zellner <i>et al.</i> , 2009	
<i>H. suaveolens</i>	Folhas	Nigéria – Eshilokun <i>et al.</i> , 2005; EUA – Ahmed <i>et al.</i> , 1994	
β-pineno	<i>H. spicigera</i>	Planta inteira	Mali – Sidibé <i>et al.</i> , 2001
		Folhas	Camarões - Tchoumboungang <i>et al.</i> , 2005; Burkina Faso - Conti <i>et al.</i> , 2011
		Inflorescências	Camarões – Noudjou <i>et al.</i> , 2007
	<i>H. lanceolata</i>	Folhas	Camarões - Tchoumboungang <i>et al.</i> , 2005
	<i>H. fruticosa</i>	Folhas	Brasil – Franco <i>et al.</i> , 2011 a e b;
		Flores	Brasil – Franco <i>et al.</i> , 2011 a e b;
	<i>H. carpinifolia</i>	Folhas	Brasil – Sá <i>et al.</i> , 2016
	<i>H. crenata</i>	Folhas e ramos	Brasil (Pará) - Zoghbi <i>et al.</i> , 2002
		Planta inteira	Brasil – Scramin <i>et al.</i> , 2000
	<i>H. conferta</i> <i>var. angustata</i>	Partes aéreas	Brasil – Ferreira <i>et al.</i> , 2005
	<i>H. pectinata</i>	Folhas	Brasil – Nascimento <i>et al.</i> , 2008
			Índia – Pietschmann <i>et al.</i> , 1998
	<i>H. mutabilis</i>	Planta inteira	Brasil (Mato Grosso) – Luz <i>et al.</i> , 1989
<i>H. suaveolens</i>	Folhas	Nigéria – Eshilokun <i>et al.</i> , 2005; Burkina Faso – Conti <i>et al.</i> , 2011; Brasil – Moreira <i>et al.</i> , 2010a; EUA – Ahmed <i>et al.</i> , 1994; Camarões – Ngassoum <i>et al.</i> , 1999; Nigéria – Asekun e Ekundayo, 2000	
	Flores	Camarões – Ngassoum <i>et al.</i> , 1999	
	Partes aéreas	Índia - Pant <i>et al.</i> , 1992	
Limoneno	<i>H. spicigera</i>	Folhas	Camarões - Tchoumboungang <i>et al.</i> , 2005; Burkina Faso - Conti <i>et al.</i> , 2011
	<i>H. crenata</i>	Folhas e ramos	Brasil (Pará) - Zoghbi <i>et al.</i> , 2002
	<i>H. martiusii</i>	Folhas	Brasil – Barbosa <i>et al.</i> , 2017
	<i>H. emoryi</i>	Inflorescências	EUA – Tucker <i>et al.</i> , 2005
	<i>H. suaveolens</i>	Folhas	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015; Burkina Faso - Conti <i>et al.</i> , 2011; EUA – Ahmed <i>et al.</i> , 1994; Camarões – Ngassoum <i>et al.</i> , 1999;
		Flores	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015; Camarões – Ngassoum <i>et al.</i> , 1999;
		Partes aéreas	Índia – Pant <i>et al.</i> , 1992; Brasil – Oliveira <i>et al.</i> , 2005
Galhos de floração		Índia – Rana <i>et al.</i> , 2004	
Δ-3-careno	<i>H. matiusii</i>	Folhas	Brasil – Araújo <i>et al.</i> , 2003
		Inflorescências	Brasil – Araújo <i>et al.</i> , 2003

Tabela 2.3 – Fitoconstituintes químicos majoritários identificados em plantas do gênero *Hyptis* (continuação)

δ -careno	<i>H. matiusii</i>	Folhas	Brasil – Barbosa <i>et al.</i> , 2017
δ -3-careno	<i>H. matiusii</i>	Folhas	Brasil – Oliveira <i>et al.</i> , 2014a
	<i>H. mutabilis</i>	Folhas e hastes	Brasil (Amapá) – Aguiar <i>et al.</i> , 2003
	<i>H. dilatata</i>	Folhas	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015
Flores		Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015	
Terpinoleno	<i>H. crenata</i>	Folhas e ramos	Brasil (Tocantins) – Zoghbi <i>et al.</i> , 2002
	<i>H. mutabilis</i>	Folhas e hastes	Brasil (Amapá)- Aguiar <i>et al.</i> , 2003
	<i>H. pectinata</i>	Folhas	Índia – Pietschmann <i>et al.</i> , 1998
	<i>H. suaveolens</i>	Folhas	Nigéria – Eshilokun <i>et al.</i> , 2005; EUA – Ahmed <i>et al.</i> , 1994; Burkina Faso – Conti <i>et al.</i> , 2011
α -Terpinoleno	<i>H. suaveolens</i>	Folhas e inflorescências	El Salvador – Grassi <i>et al.</i> , 2005
		Galhos em floração	Índia – Rana <i>et al.</i> , 2004
(+)-3-careno	<i>H. suaveolens</i>	Folhas	Brasil – Moreira <i>et al.</i> , 2010a
p-cymeno	<i>H. mutabilis</i>	Folhas e hastes	Brasil (Amapá) – Aguiar <i>et al.</i> , 2003
		Planta inteira	Brasil (nordeste) – Luz <i>et al.</i> , 1989
	<i>H. suaveolens</i>	Folhas	Nigéria – Eshilokun <i>et al.</i> , 2005; Camarões – Ngassoum <i>et al.</i> , 1999
Flores		Camarões – Ngassoum <i>et al.</i> , 1999	
p-cymen-8-ol	<i>H. suaveolens</i>	Galhos de floração	Índia – Rana <i>et al.</i> , 2004
α -terpineno	<i>H. suaveolens</i>	Folhas	Nigéria – Eshilokun <i>et al.</i> , 2005;
γ -terpineno	<i>H. mutabilis</i>	Folhas e hastes	Brasil (Amapá) – Aguiar <i>et al.</i> , 2003
	<i>H. suaveolens</i>	Folhas	EUA – Ahmed <i>et al.</i> , 1994
α -fellandrene	<i>H. mutabilis</i>	Planta inteira	Brasil (Mato Grosso) – Luz <i>et al.</i> , 1989
		Folhas	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015; Nigéria – Ogunbinu <i>et al.</i> , 2009
	<i>H. suaveolens</i>	Flores	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015
β -fellandrene	<i>H. mutabilis</i>	Planta inteira	Brasil (Mato Grosso) – Luz <i>et al.</i> , 1989
	<i>H. spicigera</i>	Flores	Camarões – Noudjou <i>et al.</i> , 2007
	<i>H. suaveolens</i>	Partes aéreas	Brasil - Martins <i>et al.</i> , 2007; Brasil - Martins <i>et al.</i> , 2006
Sabineno	<i>H. spicigera</i>	Folhas	Burkina Faso – Kini <i>et al.</i> , 1993; Burkina Faso – Conti <i>et al.</i> , 2011
		Inflorescências	Burkina Faso – Kini <i>et al.</i> , 1993; Camarões – Noudjou <i>et al.</i> , 2007;
	<i>H. mutabilis</i>	Folhas	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015
	<i>H. pectinata</i>	Folhas	Índia - Pietschmann <i>et al.</i> , 1998
	<i>H. suaveolens</i>	Planta inteira	Mali – Sidibé <i>et al.</i> , 2001
		Folhas	Burkina Faso – Conti <i>et al.</i> , 2011; Camarões – Tchoumboungang <i>et al.</i> , 2005; Brasil – Bezerra <i>et al.</i> , 2017; Costa do Marfim (M'batto) - Tonzibo <i>et al.</i> , 2009; Nigéria -Eshilokun <i>et al.</i> , 2005; ; Califórnia - Ahmed <i>et al.</i> , 1994; Camarões – Ngassoum <i>et al.</i> , 1999; Nigéria – Asekun e Ekundayo, 2000
		Hastes	Costa do Marfim (M'batto) -Tonzibo <i>et al.</i> , 2009
		Partes aéreas	Brasil -Azevedo <i>et al.</i> , 2002; Togo – Koba <i>et al.</i> , 2007; Índia – Pant <i>et al.</i> , 1992; Brasil – Oliveira <i>et al.</i> , 2005; Índia – Lohani <i>et al.</i> , 2011; Brasil – Campos <i>et al.</i> , 2002
		Folhas e inflorescências	El Salvador (sul) - Grassi <i>et al.</i> , 2005
		Flores	Camarões – Ngassoum <i>et al.</i> , 1999
Galhos em floração	Índia – Rana <i>et al.</i> , 2004		
Myrcene	<i>H. suaveolens</i>	Folhas	EUA – Ahmed <i>et al.</i> , 1994

Tabela 2.3 – Fitoconstituintes químicos majoritários identificados em plantas do gênero *Hyptis* (continuação)

Sesquiterpenos hidrocarbonados			
Composto	Espécie	Parte	País - Autor
β- caryophyllene	<i>H.spicigera</i>	Planta inteira	Mali – Sidibé <i>et al.</i> , 2001
		Folhas	Camarões - Tchoumboungang <i>et al.</i> , 2005; Burkina Faso - Conti <i>et al.</i> , 2011; Burkina Faso – Kini <i>et al.</i> , 1993
		Inflorescências/Flores	Camarões – Noudjou <i>et al.</i> , 2007; Burkina Faso – Kini <i>et al.</i> , 1993; Camarões – Noudjou <i>et al.</i> , 2007
		Partes aéreas	Togo – Koba <i>et al.</i> , 2007
	<i>H.fruticosa</i>	Folhas	Brasil – Franco <i>et al.</i> , 2011 a e b;
	<i>H.pectinata</i>	Folhas	Brasil – Santos <i>et al.</i> , 2008; Brasil – Jesus <i>et al.</i> , 2016; Índia – Pietschmann <i>et al.</i> , 1998
	<i>H.carpiniifolia</i>	Folhas	Brasil – Sá <i>et al.</i> , 2016
	<i>H.lanceolata</i>	Partes aéreas	Togo – Koba <i>et al.</i> , 2007
	<i>H.glomerata</i>	Folhas	Brasil – Silva <i>et al.</i> , 2000
		Hastes	Brasil – Silva <i>et al.</i> , 2000
	<i>H.mutabilis</i>	Planta inteira	Brasil (Mato Grosso e nordeste) – Luz <i>et al.</i> , 1989
		Partes aéreas (floração)	Argentina – Bailac <i>et al.</i> , 1999
		Partes aéreas (floração-frutificação)	Argentina – Bailac <i>et al.</i> , 1999
		Folhas e hastes	Brasil (Belém) – Aguiar <i>et al.</i> , 2003
	<i>H.crenata</i>	Folhas e ramos	Brasil (Tocantins e Pará) - Zoghbi <i>et al.</i> , 2002
		Planta inteira	Brasil – Scramin <i>et al.</i> , 2000
	<i>H.colombiana</i>	Partes aéreas	Venezuela – Flores <i>et al.</i> , 2014
	<i>H.velutina</i>	Partes aéreas	Brasil – Batista <i>et al.</i> , 2003
	<i>H.conferta</i> <i>var.angustata</i>	Partes aéreas	Brasil – Ferreira <i>et al.</i> , 2005
	<i>H.martiusii</i>	Folhas	Brasil – Araújo <i>et al.</i> , 2003
		Inflorescências	Brasil – Araújo <i>et al.</i> , 2003
	<i>H.marrubioides</i>	Flores (genótipo branco)	Brasil – Botrel <i>et al.</i> , 2009
		Folhas (genótipo branco)	Brasil – Botrel <i>et al.</i> , 2009
		Folhas (do campo)	Brasil – Botrel <i>et al.</i> , 2010b
	<i>H.floribunda</i>	Folhas	Uruguai – Dellacassa <i>et al.</i> , 1997
	<i>H.passerina</i>	Folhas	Brasil – Zellner <i>et al.</i> , 2009
	<i>H.passerina</i>	Flores	Brasil – Zellner <i>et al.</i> , 2009
<i>H.suaveolens</i>	Partes aéreas	Togo – Koba <i>et al.</i> , 2007; Índia - Pant <i>et al.</i> , 1992	
	Folhas	Burkina Faso – Conti <i>et al.</i> , 2011; Benin - Kossouh <i>et al.</i> , 2010; Camarões – Tchoumboungang <i>et al.</i> , 2005; Brasil – Bezerra <i>et al.</i> , 2017; Costa do Marfim (M'batto, Jacquville e Bouaffle) – Tonzibo <i>et al.</i> , 2009; Nigéria – Eshilokun <i>et al.</i> , 2005; Darwin (Austrália) – Peerzada, 1997; EUA – Ahmed <i>et al.</i> , 1994; Camarões – Ngassoum <i>et al.</i> , 1999; Nigéria – Asekun e Ekundayo, 2000; Tanzânia – Malele <i>et al.</i> , 2003; Nigéria – Ogunbinu <i>et al.</i> , 2009	
	Frutos	Benin - Kossouh <i>et al.</i> , 2010	
	Planta inteira	Mali – Sidibé <i>et al.</i> , 2001	
	Hastes	Costa do Marfim (M'batto) – Tonzibo <i>et al.</i> , 2009	
	Galhos de floração	Índia – Rana <i>et al.</i> , 2004	
Germacrene	<i>H.suaveolens</i>	Folhas	Brasil – Moreira <i>et al.</i> , 2010a
Germacrene B	<i>H.martiusii</i>	Inflorescências	Brasil – Araújo <i>et al.</i> , 2003
		Folhas	Brasil – Barbosa <i>et al.</i> , 2017
	<i>H.floribunda</i>	Folhas	Uruguai – Dellacassa <i>et al.</i> , 1997
	<i>H.suaveolens</i>	Folhas	EUA – Ahmed <i>et al.</i> , 1994
Germacrene D	<i>H.pectinata</i>	Folhas	Camarões - Tchoumboungang <i>et al.</i> , 2005; Brasil – Jesus <i>et al.</i> , 2016
	<i>H.lanceolata</i>	Folhas	Camarões - Tchoumboungang <i>et al.</i> , 2005

Tabela 2.3 – Fitoconstituintes químicos majoritários identificados em plantas do gênero *Hyptis* (continuação)

		Partes aéreas	Togo – Koba <i>et al.</i> , 2007
	<i>H. brevipes</i>	Folhas	Bangladesh – Bhuiyan <i>et al.</i> , 2010
	<i>H. mutabilis</i>	Partes aéreas (floração)	Argentina – Bailac <i>et al.</i> , 1999
		Partes aéreas (floração-frutificação)	Argentina – Bailac <i>et al.</i> , 1999
		Folhas	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015
	<i>H. brachiata</i>	Folhas	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015
	<i>H. colombiana</i>	Partes aéreas	Venezuela – Flores <i>et al.</i> , 2014
	<i>H. conferta</i> var. <i>conferta</i>	Partes aéreas	Brasil – Ferreira <i>et al.</i> , 2005
	<i>H. floribunda</i>	Folhas	Uruguai – Dellacassa <i>et al.</i> , 1997
	<i>H. suaveolens</i>	Folhas	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015; Costa do Marfim (Bouaffle) – Tonzibo <i>et al.</i> , 2009; Venezuela – Tesh <i>et al.</i> , 2015
		Flores	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015; Venezuela – Tesh <i>et al.</i> , 2015
Germacra-4(15), 5,10(14)-trien-1- α -ol	<i>H. marruboides</i>	Folhas	Brasil – Botrel <i>et al.</i> , 2010b
Bicyclogermacren e	<i>H. floribunda</i>	Partes aéreas	Argentina – Lopez <i>et al.</i> , 2002
	<i>H. fruticosa</i>	Folhas	Brasil – Franco <i>et al.</i> , 2011 a e b
	<i>H. mutabilis</i>	Partes aéreas (floração)	Argentina – Bailac <i>et al.</i> , 1999
		Partes aéreas (floração e frutificação)	Argentina – Bailac <i>et al.</i> , 1999
		Folhas	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015
		Folhas e hastes	Brasil (Belém) – Aguiar <i>et al.</i> , 2003
	<i>H. martiusii</i>	Folhas	Brasil – Oliveira <i>et al.</i> , 2014a; Brasil - Araújo <i>et al.</i> , 2003
	<i>H. velutina</i>	Partes aéreas	Brasil – Batista <i>et al.</i> , 2003
	<i>H. villosa</i>	Folhas	Brasil – Silva <i>et al.</i> , 2013b
	<i>H. passerina</i>	Folhas	Brasil – Zellner <i>et al.</i> , 2009
	<i>H. suaveolens</i>	Folhas	Benin – Kossouh <i>et al.</i> , 2010; Venezuela – Tesh <i>et al.</i> , 2015; Tanzânia – Malele <i>et al.</i> , 2003
		Frutos	Benin – Kossouh <i>et al.</i> , 2010
Partes aéreas		Brasil – Azevedo <i>et al.</i> , 2002; Brasil – Campos <i>et al.</i> , 2002	
Flores		Venezuela – Tesh <i>et al.</i> , 2015	
α -copaene	<i>H. floribunda</i>	Folhas	Uruguai – Dellacassa <i>et al.</i> , 1997
	<i>H. marruboides</i>	Folhas	Brasil – Sales <i>et al.</i> , 2009
γ -cadinene	<i>H. floribunda</i>	Partes aéreas	Argentina – Lopez <i>et al.</i> , 2002
		Folhas	Brasil – Silva <i>et al.</i> , 2000
	<i>H. glomerata</i>	Hastes	Brasil – Silva <i>et al.</i> , 2000
		Inflorescências	Brasil – Silva <i>et al.</i> , 2000
δ -cadinene	<i>H. floribunda</i>	Partes aéreas	Argentina – Lopez <i>et al.</i> , 2002
α -boubonene	<i>H. brevipes</i>	Inflorescências	Bangladesh – Bhuiyan <i>et al.</i> , 2010
α -selinene	<i>H. mutabilis</i>	Folhas	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015
β -selinene	<i>H. mutabilis</i>	Folhas	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015
α - bergamotene	<i>H. spicigera</i>	Partes aéreas	Togo – Koba <i>et al.</i> , 2007
E-caryophyllene	<i>H. dilata</i>	Folhas	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015
		Flores	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015
	<i>H. brachiata</i>	Folhas	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015
	<i>H. marruboides</i>	Folhas	Brasil –Sales <i>et al.</i> , 2009
	<i>H. suaveolens</i>	Folhas	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015
		Flores	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015
Partes aéreas		Brasil -Azevedo <i>et al.</i> , 2002; Brasil – Oliveira <i>et al.</i> , 2005; Brasil – Campos <i>et al.</i> , 2002	
α -caryophyllene	<i>H. spicigera</i>	Partes aéreas	Togo – Koba <i>et al.</i> , 2007
α -humulene	<i>H. brachiata</i>	Folhas	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015
	<i>H. suaveolens</i>	Folhas	Índia -Joy <i>et al.</i> , 2008

Tabela 2.3 – Fitoconstituintes químicos majoritários identificados em plantas do gênero *Hyptis* (continuação)

γ-muurolene	<i>H. velutina</i>	Partes aéreas	Brasil – Batista <i>et al.</i> , 2003
	<i>H. marrubioides</i>	Flores (genótipo branco)	Brasil – Botrel <i>et al.</i> , 2009
		Folhas (genótipo roxo)	Brasil – Botrel <i>et al.</i> , 2009
		Folhas (do campo)	Brasil – Botrel <i>et al.</i> , 2010b
δ-muurolene	<i>H. marrubioides</i>	Folhas	Brasil – Sales <i>et al.</i> , 2009
allo-aromadendrene	<i>H. suaveolens</i>	Folhas	Índia -Joy <i>et al.</i> , 2008
β-elemene	<i>H. mutabilis</i>	Planta inteira	Brasil (nordeste) – Luz <i>et al.</i> , 1989
		Folhas	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015; Tanzânia – Malele <i>et al.</i> , 2003
	<i>H. lanceolata</i>	Partes aéreas	Togo – Koba <i>et al.</i> , 2007
candina-4,10(15)-dien-3-one	<i>H. verticillata</i>	Partes aéreas	Jamaica – Facey <i>et al.</i> , 2005
γ-elemene	<i>H. ovalifolia</i>	Folhas	Brasil – Oliveira <i>et al.</i> , 2004
	<i>H. suaveolens</i>	Folhas	Brasil – Moreira <i>et al.</i> , 2010a
γ-cadine	<i>H. ovalifolia</i>	Folhas	Brasil – Oliveira <i>et al.</i> , 2004
trans-α-bergamotene	<i>H. suaveolens</i>	Folhas	Benin – Kossouh <i>et al.</i> , 2010; Nigéria – Eshilokun <i>et al.</i> , 2005; Nigéria – Assekun <i>et al.</i> , 2000; Tanzânia – Malele <i>et al.</i> , 2003.
		Frutos	Benin – Kossouh <i>et al.</i> , 2010
		Planta inteira	Mali – Sidibé <i>et al.</i> , 2001
Cis-α-bergamotene	<i>H. suaveolens</i>	Folhas e hastes	Camarões – Ngassoum <i>et al.</i> , 1999
		Flores	Camarões – Ngassoum <i>et al.</i> , 1999
		Folhas	Camarões – Ngassoum <i>et al.</i> , 1999
Cis-calamene	<i>H. glomerata</i>	Hastes	Brasil – Silva <i>et al.</i> , 2000
Trans-caryophyllene	<i>H. martiusii</i>	Folhas	Brasil – Oliveira <i>et al.</i> , 2004
Trans-β-caryophyllene	<i>H. suaveolens</i>	Folhas	Brasil – Moreira <i>et al.</i> , 2010a
Sesquiterpenos oxigenados			
Composto	Espécie	Parte	País - Autor
Elemol	<i>H. floribunda</i>	Partes aéreas	Argentina – Lopez <i>et al.</i> , 2002
Caryophyllene	<i>H. brevipes</i>	Inflorescências	Bangladesh – Bhuiyan <i>et al.</i> , 2010
		Folhas	Bangladesh – Bhuiyan <i>et al.</i> , 2010
	<i>H. pectinata</i>	Folhas	Brasil – Nascimento <i>et al.</i> , 2008
	<i>H. suaveolens</i>	Partes aéreas	China - Xu <i>et al.</i> , 2013
Caryophyllene oxide	<i>H. brevipes</i>	Inflorescências	Bangladesh – Bhuiyan <i>et al.</i> , 2010
		Folhas	Bangladesh – Bhuiyan <i>et al.</i> , 2010
	<i>H. pectinata</i>	Folhas	Brasil – Nascimento <i>et al.</i> , 2008; Brasil – Jesus <i>et al.</i> , 2016; Brasil - Santos <i>et al.</i> , 2008
		Partes aéreas	Togo – Koba <i>et al.</i> , 2007
	<i>H. ovalifolia</i>	Folhas	Brasil – Oliveira <i>et al.</i> , 2004
	<i>H. martiusii</i>	Folhas	Brasil – Oliveira <i>et al.</i> , 2014a
	<i>H. conferta</i>	Inflorescência	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015
	<i>H. suaveolens</i>	Folhas	Benin – Kossouh <i>et al.</i> , 2010; Nigéria – Ogunbinu <i>et al.</i> , 2009;
		Frutos	Benin – Kossouh <i>et al.</i> , 2010
		Partes aéreas	Brasil – Azevedo <i>et al.</i> , 2002; Cuba – Pino <i>et al.</i> , 2003
Galhos em floração		Índia – Rana <i>et al.</i> , 2004	
Viridiflorol	<i>H. ovalifolia</i>	Folhas	Brasil – Oliveira <i>et al.</i> , 2004

Tabela 2.3 – Fitoconstituintes químicos majoritários identificados em plantas do gênero *Hyptis* (continuação)

Spathulenol	<i>H. fruticosa</i>	Folhas	Brasil - Franco <i>et al.</i> , 2011b e a	
		Flores	Brasil - Franco <i>et al.</i> , 2011b e a	
		Sementes	Brasil - Franco <i>et al.</i> , 2011b	
	<i>H. villosa</i>	Folhas	Brasil - Silva <i>et al.</i> , 2013b	
		<i>H. passerina</i>	Folhas	Brasil - Zellner <i>et al.</i> , 2009
	Flores		Brasil - Zellner <i>et al.</i> , 2009	
	<i>H. suaveolens</i>	Folhas	Brasil - Bezerra <i>et al.</i> , 2017; Tanzânia - Malele <i>et al.</i> , 2003	
Partes aéreas		Brasil - Azevedo <i>et al.</i> , 2002; Brasil - Martins <i>et al.</i> , 2006; Brasil - Martins <i>et al.</i> , 2007; Brasil - Oliveira <i>et al.</i> , 2005; Brasil - Campos <i>et al.</i> , 2002		
Galhos em floração		Índia - Rana <i>et al.</i> , 2004		
Eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol	<i>H. marrubioides</i>	Folhas (greenhouse)	Brasil - Botrel <i>et al.</i> , 2010b	
T-cadinol	<i>H. conferta</i> var. <i>conferta</i>	Inflorescências	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015	
		Partes aéreas	Brasil - Ferreira <i>et al.</i> , 2005	
Globulol	<i>H. glomerata</i>	Inflorescências	Brasil - Silva <i>et al.</i> , 2000	
		<i>H. mutabilis</i>	Folhas e hastes	Brasil (Amapá)- Aguiar <i>et al.</i> , 2003
			<i>H. suaveolens</i>	Partes aéreas
Humulene epoxide	<i>H. pectinata</i>	Partes aéreas	Togo- Koba <i>et al.</i> , 2007	
(Z)-trans- α -bergamotol	<i>H. suaveolens</i>	Folhas	Benin - Kossouh <i>et al.</i> , 2010	
		Frutos	Benin - Kossouh <i>et al.</i> , 2010	
Guaiol	<i>H. glomerata</i>	Folhas	Brasil - Silva <i>et al.</i> , 2000	
		Inflorescências	Brasil - Silva <i>et al.</i> , 2000	
α -bisabolol	<i>H. conferta</i> var. <i>conferta</i>	Partes aéreas	Brasil - Ferreira <i>et al.</i> , 2005	
α -cadinol	<i>H. marrubioides</i>	Folhas (greenhouse)	Brasil - Botrel <i>et al.</i> , 2010b	
		<i>H. suaveolens</i>	Brasil - Martins <i>et al.</i> , 2006; Brasil - Martins <i>et al.</i> , 2007	
B-epi-acorenol	<i>H. passerina</i>	Folhas	Brasil - Zellner <i>et al.</i> , 2009	
		Flores	Brasil - Zellner <i>et al.</i> , 2009	
Outros sesquiterpenos				
Composto	Espécie	Parte	País - Autor	
Ledene/ viridiflorene	<i>H. emoryi</i>	Inflorescências	EUA - Tucker <i>et al.</i> , 2005	
	<i>H. martiusii</i>	Inflorescências	Brasil - Araújo <i>et al.</i> , 2003	
<i>cis</i> -muuro-5-en-4 α -ol	<i>H. marrubioides</i>	Folhas	Brasil - Botrel <i>et al.</i> , 2010b	
aromadendr-1(10)-en-9-one	<i>H. verticillata</i>	Partes aéreas	Jamaica - Facey <i>et al.</i> , 2005	
Trans-cadina-1(6),4-diene	<i>H. carpinifolia</i>	Folhas	Brasil - Sá <i>et al.</i> , 2016	
Bergamotol	<i>H. suaveolens</i>	Folhas	Camarões - Tchoumboungang <i>et al.</i> , 2005	
Palustrol	<i>H. dilata</i>	Folhas e flores	Colômbia -Tafurt-Garcia <i>et al.</i> , 2015	
		<i>H. suaveolens</i>	Costa do Marfim (M'batto)- Tonzibo <i>et al.</i> , 2009	
epi- α -cadinol	<i>H. villosa</i>	Folhas	Brasil - Silva <i>et al.</i> , 2013b	
Calamusenone	<i>H. pectinata</i>	Folhas	Brasil - Santos <i>et al.</i> , 2008	
Diterpenos				
Composto	Espécie	Parte	País - Autor	
Hydrocarbon II	<i>H. suaveolens</i>	Folhas	Costa do Marfim (M'batto)- Tonzibo <i>et al.</i> , 2009	
		Hastes	Costa do Marfim (M'batto)- Tonzibo <i>et al.</i> , 2009	
Abietatriene	<i>H. passerina</i>	Folhas	Brasil - Zellner <i>et al.</i> , 2009	
		Flores	Brasil - Zellner <i>et al.</i> , 2009	
	<i>H. suaveolens</i>	Galhos em floração	Índia - Rana <i>et al.</i> , 2004	
Abietadiene	<i>H. suaveolens</i>	Galhos em floração	Índia - Rana <i>et al.</i> , 2004	
Dehydroabietol	<i>H. suaveolens</i>	Partes aéreas	Brasil - Martins <i>et al.</i> , 2006; Brasil - Martins <i>et al.</i> , 2007	

Tabela 2.3 – Fitoconstituintes químicos majoritários identificados em plantas do gênero *Hyptis* (continuação)

Derivados de fenilpropano			
Composto	Espécie	Parte	País - Autor
p-eugene	<i>H.recurvata</i>	Folhas	Peru – Leclercq <i>et al.</i> , 2000
Methyl eugenol	<i>H.brevipes</i>	Partes aéreas	China -Xu <i>et al.</i> , 2013
Outros constituintes			
Composto	Espécie	Parte	País - Autor
Benzyl benzoate (Ester)	<i>H.suaveolens</i>	Folhas	Costa do Marfim (M'batto)– Tonzibo <i>et al.</i> , 2009
Phthalamide doxime	<i>H.brevipes</i>	Folhas	Bangladesh – Bhuiyan <i>et al.</i> , 2010
1,5,5,8-tetamethyl-12-oxabicyclo[9.1.0]dodeca-3,7-diene	<i>H.brevipes</i>	Folhas	Bangladesh – Bhuiyan <i>et al.</i> , 2010
Butylated hydroxytoluene	<i>H.rhomboidea</i>	Partes aéreas	China – Xu <i>et al.</i> , 2013
Palmitic acid (ácido graxo)	<i>H.rhomboidea</i>	Partes aéreas	China – Xu <i>et al.</i> , 2013
3-allylguaiacol	<i>H.brevipes</i>	Partes aéreas	China – Xu <i>et al.</i> , 2013
Prenopsan-8-ol	<i>H.carpinifolia</i>	Folhas	Brasil – Sá <i>et al.</i> , 2016
6-hydroxycarvotana cetone	<i>H.suaveolens</i>	Folhas	Benin – Kossouh <i>et al.</i> , 2010
Curzerene	<i>H.mutabilis</i>	Partes aéreas (floração)	Argentina – Bailac <i>et al.</i> , 1999
		Partes aéreas (floração-frutificação)	Argentina – Bailac <i>et al.</i> , 1999
(E)methyl cinnamate	<i>H.mutabilis</i>	Folhas e hastes	Peru – Aguiar <i>et al.</i> , 2003
(Z)methyl cinnamate	<i>H.mutabilis</i>	Folhas e hastes	Peru – Aguiar <i>et al.</i> , 2003
Kessane	<i>H.villosa</i>	Folhas	Brasil – Silva <i>et al.</i> , 2013b
Myrcenone	<i>H.mutabilis</i>	Partes aéreas	Argentina – Velasco-Negueruela <i>et al.</i> , 1995
Cis-dihydrocarvone	<i>H.mutabilis</i>	Partes aéreas	Argentina – Velasco-Negueruela <i>et al.</i> , 1995
Trans-dihydrocarvone	<i>H.mutabilis</i>	Partes aéreas	Argentina – Velasco-Negueruela <i>et al.</i> , 1995
5-caranol	<i>H.suaveolens</i>	Folhas	Índia – Joy <i>et al.</i> , 2008
Ermepilene	<i>H.suaveolens</i>	Folhas	Índia – Joy <i>et al.</i> , 2008
Cis-sabinol	<i>H.suaveolens</i>	Folhas	Índia – Joy <i>et al.</i> , 2008

2.3.1.2 Atividades farmacológicas

Por serem muito utilizadas na medicina tradicional em vários países, as plantas desse gênero despertam o interesse de grande número de pesquisadores por novas fontes de fitoconstituintes bioativos com propriedades biológicas farmacologicamente interessantes. Estes passaram a testar as atividades biológicas da biomassa seca, de extratos, de óleos essenciais e de compostos isolados de extratos e óleos de diferentes partes das plantas *Hyptis*.

ATIVIDADES BIOLÓGICAS ESPÉCIES	antimicrobial	regeneração hepática	antidepressiva	antiedematogênica	antinociceptiva	citotoxicidade	toxicidade	anti-inflamatória	inseticida	repelente	antioxidante	antidiabética	cicatrizante	genotoxicidade	moluscicida	(cito, hepa, gastro e neuro) proteção	acaricida	antiproliferativa	antissecretora	espasmolítica	vasorelaxante	antitumorogênica	hipotensão associada à taquicardia	sedativa	anticonvulsante
	<i>Hyptis marruboides</i> (óleo essencial)	2																							
<i>Hyptis pectinata</i> (extrato)	2	4	1	1	3	2	1																		
<i>Hyptis pectinata</i> (compostos isodados de extrato)	1																								
<i>Hyptis pectinata</i> (óleo essencial)	3				2			1	2		1														
<i>Hyptis pectinata</i> (compostos isolados de óleo essencial)											1														
<i>Hyptis suaveolens</i> (extrato)	7				1	1			7		3	2	2	1	1	4									
<i>Hyptis suaveolens</i> (compostos isolados de extrato)	1					1		1			1					1									
<i>Hyptis suaveolens</i> (óleo essencial)	14						2		7	6	2														
<i>Hyptis suaveolens</i> (óleo de semente)	1																								
<i>Hyptis suaveolens</i> (compostos isolados de óleo de semente)									1																
<i>Hyptis suaveolens</i> (compostos isodados)								1																	
<i>Hyptis suaveolens</i> (biomassa vegetal)	2								3	1															
<i>Hyptis</i> spp. (extrato)	12	1			3	3	1	3	2		8								1		1			1	1
<i>Hyptis</i> spp. (compostos isodados de extrato)	2					4		1	1		1						1	1	1	1					
<i>Hyptis</i> spp. (óleo essencial)	13			1	3	3	2	1	9	1	2					4	1					2	1		
<i>Hyptis</i> spp. (compostos isodados de óleo essencial)	1								1					1		1									
<i>Hyptis</i> spp. (biomassa vegetal)									3																

Tabela 2.4 – Principais atividades biológicas do gênero *Hyptis*. Os números indicam a quantidade de trabalhos publicados por atividade biológica.

Inúmeras atividades biológicas foram comprovadas cientificamente, como atividade antibacteriana (Goly *et al.*, 2015; Salini *et al.*, 2015; Flores *et al.*, 2014; Tesch *et al.*, 2015; Bachheti *et al.*, 2015; Kerdudo *et al.*, 2016; Andrade *et al.*, 2017b; De Figueirêdo *et al.*, 2018), antifúngica (Khonkarn *et al.*, 2015; Bachheti *et al.*, 2015; Malele *et al.*, 2003; Falcão *et al.*, 2016; Kerdudo *et al.*,

2016; Begum *et al.*, 2016a, 2016b; Simões *et al.*, 2017; Muthamil *et al.*, 2018;), anti-inflamatória (Andrade *et al.*, 2010; Raymundo *et al.*, 2011; Miranda *et al.*, 2013; Bayala *et al.*, 2014; Dos Anjos *et al.*, 2017;), citotóxica (Barbosa *et al.*, 2012; Hamada *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2013; Deepika *et al.*, 2013; De Figueirêdo *et al.*, 2018), genotóxica (Cavalcanti *et al.*, 2008; Sumitha e Thoppil *et al.*, 2016), neuroprotetora (Ghaffari *et al.*, 2014), gastroprotetora (Diniz *et al.*, 2013; Jesus *et al.*, 2013; Caldas *et al.*, 2014; Rocha *et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2018), antioxidante (Andrade *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010; Deepika *et al.*, 2013; Ghaffari *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Bayala *et al.*, 2014; Serafini *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2018), antiproliferativa (Amado *et al.*, 2009). Além disso, muitas espécies são usadas contra pragas de produtos armazenados e contra mosquitos caracterizando uma atividade inseticida e/ou repelente (Abagli *et al.*, 2012; Benelli *et al.*, 2012; Vongsombath *et al.*, 2012; Conti *et al.*, 2012; Sakr *et al.*, 2013; Jaya *et al.*, 2014; Pavunraj *et al.*, 2014; Sakr e Roshdy, 2015; Feitosa-Alcantara *et al.*, 2017; Elumalai *et al.*, 2017; Hari e Mathew, 2018). Informações sobre as atividades biológicas do gênero *Hyptis* foram representadas na tabela 2.4.

Para a espécie *H. suaveolens* verificaram-se atividades biológicas em extratos, óleo essencial e compostos isolados. A atividade antimicrobiana foi a mais descrita para extratos, óleo essencial e compostos isolados. Também, verificou-se atividade inseticida, repelente, antioxidante, antidiabética, antinociceptiva, cicatrizante, citotoxicidade, genotoxicidade e antimoluscida.

Já *H. pectinata* apresentou extratos com atividades de regeneração hepática, antinociceptiva, citotoxicidade, antidepressiva, antiedematogênico, antitumoral e toxicidade; óleo essencial com atividades anti-inflamatória, inseticida e repelente, e compostos isolados com atividade antioxidante. As atividades antimicrobianas aparecem em extratos, óleos e compostos isolados. No caso de *H. marrubioides* dois artigos sobre atividades biológicas foram incluídos nesta revisão. Estes versam sobre a atividade antimicrobiana do óleo essencial.

2.3.1.2.1 Atividade antimicrobiana

Nos últimos anos, patologias associadas a microorganismos, como as bactérias, os fungos, os vírus e os protozoários têm se tornado cada vez mais frequentes ocasionando graves prejuízos à saúde humana e a consequente demanda por agentes antimicrobianos. As plantas destacaram-se como uma alternativa natural pela presença de muitos fitoconstituintes com ação medicinal que poderiam gerar

menores efeitos colaterais e maior eficácia que os medicamentos sintéticos atualmente utilizados no mercado (Nantitanon *et al.*, 2007; Begum *et al.*, 2016b).

O conteúdo e o tipo de compostos fenólicos encontrados nos óleos essenciais e extratos de várias espécies do gênero *Hyptis* estão entre os fatores determinantes da sua atividade antimicrobiana (Tafurt-Garcia *et al.*, 2015). As espécies deste gênero possuem, atividade antifúngica (Khonkarn *et al.*, 2015; Bachheti *et al.*, 2015; Malele *et al.*, 2003; Falcão *et al.*, 2016; Kerdudo *et al.*, 2016; Simões *et al.*, 2017; Muthamil *et al.*, 2018;), antiviral (Matsuse *et al.*, 1999; Kothandan e Swaminathan, 2014) , antibacteriana (Goly *et al.*, 2015; Salini *et al.*, 2015; Flores *et al.*, 2014; Tesch *et al.*, 2015; Bachheti *et al.*, 2015; Kerdudo *et al.*, 2016; Andrade *et al.*, 2017b; De Figueirêdo *et al.*, 2018), e antiprotozoa (De Queiroz *et al.*, 2014; Falcao *et al.*, 2013; Chukwujekwu *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2017; Cunha *et al.*, 2017).

2.3.1.2.1.1 Extratos vegetais

Os extratos etanólico, hexano, metanol, aquoso e éter de petróleo, preparados, principalmente, com folhas, foram os mais utilizados para extração de compostos antimicrobianos (tabela 2.5). Também há trabalhos envolvendo extratos de acetato de etila, diclorometano e cloreto de metila. Os estudos com *H. martiusii* foram os que mais envolveram o extrato etanólico.

As bactérias e fungos foram os microorganismos mais aplicados nos testes. Há contudo trabalhos com protozoários e, inclusive, com vírus importantes na área da saúde humana como HIV e Chikungunya. *Hyptis suaveolens* sobressaiu-se pelo maior número de trabalhos para atividade antimicrobiana. Além disso, apresentou atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral e antiplasmodial comprovadas.

2.3.1.2.1.2 Óleo essencial

Os óleos essenciais de plantas *Hyptis* spp. mostraram atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de microorganismos, sobressaindo-se bactérias e fungos resistentes a antibióticos e antifúngicos, respectivamente (tabela 2.6). Folhas, flores, sementes e partes aéreas foram utilizadas para

extração do óleo. Entre as espécies ativas destaca-se *Hyptis suaveolens*, *Hyptis mutabilis*, *Hyptis martiusii*, *Hyptis marrubioides*, *Hyptis ovalifolia*, *Hyptis pectinata*, *Hyptis verticilata*, *Hyptis rhomboidea*, e *Hyptis brevipes*, *Hyptis atrorubens*, *Hyptis fasciculata*, *Hyptis colombiana*.

As bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, associadas com infecções do trato gastrointestinal e doenças da pele, estão evidenciadas na maioria dos estudos. Além delas, também, há trabalhos com *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Klesbsiella pneumoniae*, *Salmonela typhi*, *Proteus murabilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus mutans*, *Salmonella pyogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri* e *Vibrio vulnificus*.

Quanto aos fungos, destacaram-se *Aspergillus* spp. que provocam contaminação e/ou deteriorização alimentar e *Candidas* spp. que causam doenças no homem. Os *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus* são preocupantes por serem responsáveis por deterioração de alimentos após colheita e pela produção de aflatoxinas de natureza hepatocarcinogênica, teratogênica, mutagênica e imunossupressora (Jaya *et al.*, 2011). Já a *Candida albicans* e *Candida tropicalis* são fungos oportunistas presentes na microbiota normal das mucosas, no trato respiratório, gastrointestinal e no trato genital feminino capazes de gerar as infecções denominadas candidíase (Deepa *et al.*, 2014; Sardi *et al.*, 2013). Outros fungos relatados foram *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium graminearum*, *Botrytis cinérea*, *Exerohilum turcicum*, *Mucor* sp., *Scharomyces cerevisae*, *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Sclerotinia sclerofiorum*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium debaryanum*.

Para atividade antiprotozoa relata-se um estudo sobre a avaliação de infecções em peixes pelo parasita *Ichthyophthirius multifiliis* (ich).

2.3.1.2.2 Atividade antioxidante

Os extratos metanólicos e etanólicos foram os compostos mais explorados para atividade antioxidante em diferentes espécies de *Hyptis* (Tabela 2.7). Todavia, há estudos com óleos essenciais e compostos isolados. Entre as partes da planta utilizada, as folhas foram a grande maioria. O ensaio *in vitro* com avaliação quanto à capacidade de inibir a redução do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) foi realizado para quase todos os estudos. Também há registros de ensaios *in vitro* ABTS [sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzenotiazolina6-sulfônico), FRAP (poder de redução do íon

ferro), ORAC (Capacidade de Absorvância do Radical Oxigênio) , ânion superóxido, TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico), NO (óxido nítrico), OH (radicais hidroxila), radicais de peróxido de hidrogênio.

Hyptis suaveolens é a planta mais relatada para a propriedade antioxidante pelo método DPPH havendo pesquisas com óleo essencial e extratos metanólicos, de acetato de etila, de n-hexano e de acetona extraídos de folhas ou partes aéreas da planta. Outras metodologias antioxidantes usadas foram superóxido, peróxido de hidrogênio, FRAP, TBARS. O óleo essencial de *Hyptis pectinata* também, mostrou sua capacidade de reduzir os radicais livres e ter grande capacidade antioxidante nos testes ORAC, superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, óxido nítrico. Isso porque em seu óleo encontra-se o composto calamusenona capaz de eliminar os radicais peroxila, extinguir os radicais hidroxila e os ânions superóxidos e reduzir a formação de radicais de óxido nítrico (Serafini *et al.*, 2017).

2.3.1.2.3 Atividade antinociceptiva, anticonvulsivante e sedativa

A nociceção é um mecanismo pelo qual os estímulos periféricos são transmitidos ao sistema nervoso central e percebidos como dor pelo organismo (Dubin e Patapoutian, 2010; Garland, 2012). A dor, apesar de desagradável, é um sinal característico dos mecanismos normais de proteção do organismo contra o dano tecidual (Klaumann *et al.*, 2008). Contudo, muitas das vezes, a dor precisa ser aliviada por substâncias com ação antinociceptiva e, portanto, capazes de anular ou reduzir a percepção e transmissão de estímulos que causam a dor (Klaumann *et al.*, 2008). Conforme alguns estudos essas substâncias analgésicas estão sendo encontradas em plantas que podem se tornar grandes aliadas na medicina (Siqueira-Lima *et al.*, 2014; Quintans *et al.*, 2014). A espécie *Hyptis pectinata* é a mais estudada para propriedades antinociceptivas (Tabela 2.8). Seus óleos essenciais e extratos (aquosos, de acetato de etila, de clorofórmio, de hexano e hidroetanólico), extraídos de folhas e partes aéreas, têm sido aplicados em camundongos em ensaios de contorções induzidas, formalina e placa quente com bons resultados. Além dela, *Hyptis fruticosa*, *Hyptis spicigera* e *Hyptis suaveolens* também tiveram ação antinociceptiva relatada.

Quanto a atividade sedativa e anticonvulsivante, apenas *Hyptis spicigera* foi avaliada. *Hyptis spicigera* protegia 100 e 87,5% de camundongos contra convulsões induzidas por estriçnicina e pentileno-

tetrazol, respectivamente, a uma dose de 160 mg/kg. Seu extrato aquoso aumentou consideravelmente a duração total do sono em camundongos induzida por diazepam.

2.3.1.2.4 Atividade citotóxica, genotóxica e antiproliferativa

Há registros de ensaios de citotoxicidade para extratos, óleos essenciais e compostos isolados de *Hyptis* quanto a capacidade em promover alterações metabólicas em diversas linhagens celulares, culminando ou não em morte celular em ensaios *in vitro* e *in vivo* (Tabela 2.9).

Alguns ensaios citotóxicos tentavam descobrir se a planta utilizada na medicina tradicional apresentava toxicidade à saúde humana. Neste caso, buscava-se uma citotoxicidade negativa. O extrato etanólico de *H. martiusii* demonstrou nível moderado de toxicidade *in vitro* contra células macrófagas J774 e foi considerado uma alternativa promissora para substituição de medicamentos usados no tratamento da doença de Chagas, considerados muito tóxicos (Santos *et al.*, 2013). Em outro estudo, óleo essencial de *H. mutabilis* mostrou atividade não citotóxica para a linhagem celular Vero (Zapata *et al.*, 2009) sendo também, promissor como medicamento contra *Aspergillus fumigatus*.

Outros ensaios citotóxicos visavam a determinação da atividade antitumoral com resultados de citotoxicidade positiva. Bons resultados foram observados para *H. martiusii* em células B16 (pele murina), HCT-8 (côlon humano), MCF-7 (mama humana), CEM, macrófagos J774 e fibroblastos de mamíferos ATCC CCL-1; para *H. verticillata* em células HT29 (carcinoma do cólon), célula KB (carcinoma epidermóide), células leucêmicas T adultas e outras células cancerígenas e *H. incana* em neuroblastoma humano IMR-32, LA-N-1 e SK-N-SH. Compostos isolados de *H. suaveolens* produziram potentes efeitos sobre as células cancerígenas MCF-7

Um estudo bastante interessante foi feito com o extrato hidroetanólico de *H. pectinata* em testes *in vitro* contra linhagens de células tumorais humanas e *in vivo* utilizando sarcoma 180 em camundongos (Barbosa *et al.*, 2012). No ensaio *in vitro* apresentou citotoxicidade moderada (62%) contra células HCT-8 e no ensaio *in vivo* inibiu o sarcoma 180 em 70,5%. Dessa forma, esta espécie apresentou eficiente atividade contra o câncer nos ensaios *in vivo* e *in vitro* comprovando o potencial de plantas medicinais como antitumorais.

Outros ensaios fizeram uso do ensaio *in vivo* para determinação da toxicidade e, em caso positivo, partem para um ensaio *in vitro* para testar atividades citotóxicas para células tumorais.

Resultados de citotoxicidade significativa contra o crustáceo *Artemia salina*, onde o óleo essencial foi duas vezes maior que o extrato metanólico, foi relatado por Rebelo e colaboradores (2009). A toxicidade para este crustáceo tem demonstrado uma boa correlação com a atividade citotóxica contra tumores humanos (McLaughlin *et al.*, 1991) e contra o *Trypanosoma cruzi* (Alves *et al.* 2000; Zani *et al.* 1995), protozoário causador da doença de Chagas (Amarante *et al.*, 2011).

Sobre os potenciais riscos genéticos (genotoxicidade) dos compostos presentes nas plantas *Hyptis* spp. há poucos estudos. Dois deles retratam testes com células do pulmão de hamster chinês e células da cebola (*Allium cepa*) tratadas com tansinonas de *H. martiusii* e extrato aquoso de *H. suaveolens*, respectivamente (Cavalcanti *et al.*, 2008; Sumitha e Thoppil., 2016). Ambos tiveram atividade genotóxica.

Já a atividade antiproliferativa com a interferência da isoquercitrina isolada de partes aéreas de *H. fasciculata* no crescimento celular de glioblastoma (Gbm) foi confirmada por Amado e colaboradores (2009). A isoquercitrina reduziu o crescimento das células Gbm sem indução da apoptose.

2.3.1.2.5 Atividade de regeneração hepática, gastroprotetora, hepatoprotetora, citoprotetora, neuroprotetora, cicatrizante, antiulcerogênica

Atualmente, as condições patológicas que acometem o sistema digestivo e glândulas anexas a ele tem provocado grandes transtornos à saúde humana. Desta forma, não é de se admirar a existência de trabalhos com espécies do gênero *Hyptis* frente à atividade gastroprotetora, hepatoprotetora, regeneração hepática, cicatrizante e antisecretora (Tabela 2.10).

Os ensaios de gastroproteção são relevantes para determinar se os extratos podem contribuir para melhoria no tratamento de lesões de mucosa gástrica, incluindo, as úlceras. Há trabalhos com óleo essenciais, extratos e compostos isolados para *Hyptis* ssp. extraídos, principalmente, de partes aéreas e avaliados em ensaios *in vivo* (roedores) com indução de úlcera gástrica. *H. crenata*, *H. martiusii*, *H. mutabilis*, *H. spcigera* e *H. suaveolens* foram as espécies mais utilizadas neste modelo.

Em casos de lesões em tecidos de órgãos como do fígado, o organismo tende a reparar os danos por meio da regeneração e/ou cicatrização. Na regeneração hepática partes dos tecidos danificados são reparados completamente pelo crescimento de novas células (Krafts, 2010). Já na cicatrização os tecidos

danificados ou não regeneráveis são reparados pela deposição de tecido conjuntivo (Krafft, 2010). Para analisar se os extratos promovem a cicatrização ou desempenham algum efeito gastroprotetor contra a lesão hepática induzida, alguns testes foram realizados para as duas atividades. A capacidade de regeneração hepática foi confirmada em extratos aquosos de folhas de *H. pectinata* e *H. fruticosa* enquanto que o efeito cicatrizante foi atestado no extrato etanólico e éter de petróleo de *H. suaveolens*.

O composto sideritoflavona isolado de *H. verticillata* exibiu atividade antissecretora ao inibir a secreção de ácido clorídrico em cólon dital isolado de coelho podendo ser usado no tratamento de dor estomacal (Kuhnt *et al.*, 1995). *Hyptis suaveolens* apresentou estudos quanto a hepatoproteção, citoproteção e neuroproteção despertando a atenção para o potencial protetor de seus extratos contra efeitos tóxicos de radicais livres e outras substâncias resultantes de stress oxidativo.

2.3.1.2.6 Atividade inseticida, repelente e acaricida

Os problemas ocasionados por insetos podem envolver ameaças à saúde pública. Primeiro, por serem vetores de doenças como a dengue que acomete milhares de pessoas em várias regiões tropicais do mundo (Conti *et al.*, 2012). Segundo, por serem responsáveis por graves perdas econômicas ao acometerem grãos de cereais ou farinha durante o armazenamento com danos a qualidade, quantidade, valor comercial e agrônômico do produto (Kouninki *et al.*, 2005). O uso de produtos naturais como repelentes ou pesticidas para controle desses insetos, considerados pragas, foram estudados para espécies do gênero *Hyptis* com bons resultados.

Quanto à atividade inseticida a Índia é o país com maior número de estudos para a espécie *H. suaveolens*, seguida da Nigéria. Outros países como Brasil (*H. martiusii*, *H. pectinata* e *H. fruticosa*), Burkina Faso (*H. spicigera*), Equador (*H. brevipes*), Jamaica (*H. verticillata*), Quênia (*H. spicigera*), Camarões (*H. spicigera* e *H. suaveolens*), México (*H. suaveolens*), Nepal (*H. suaveolens*) e Itália (*H. suaveolens*) também fizeram importantes contribuições sobre essa atividade.

Hyptis suaveolens destaca-se como um inseticida promissor contra diferentes tipos de insetos. Seu óleo essencial exibiu forte atividade contra *Callosobruchus maculatus*, possivelmente, devido a presença de 1,8 cineol (Ilboudo *et al.*, 2010; Tripathi e Upadhyay, 2009), *Tribolium castaneum* (Jaya *et al.*, 2014; Tripathi e Upadhyay, 2009), larvas de *Aedes albopictus*, sendo o terpinoleno o composto puro mais efetivo (Conti *et al.*, 2012), *Rhyzopatha dominica*, *Sitophilus oryzae* (Tripathi e Upadhyay,

2009). Já o extrato metanólico revelou alta capacidade inseticida no controle de *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus zeamais* e *Callosobruchus maculatus* (Olotuah *et al.*, 2013) e o vetor da filariose, *Culex quinquefasciatus* (Kovendan *et al.*, 2012). O extrato de éter petróleo demonstrou ser ativo contra larvas de *Aedes Aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (Hari e Mathew, 2018) e o extrato hexano, clorofórmio e acetato de etila foram excelentes no controle do *Culex quinquefasciatus* (Kovendan *et al.*, 2012). Este último também, exibiu potencial antifeedants e inseticida contra os lepidópteros *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura*, *Earias vittella* e *Leucinodes orbonalis*. Outro trabalho interessante e atual foi realizado com nanopartículas de prata sintetizada a partir de extrato aquoso de *H. suaveolens* com índice de mortalidade de 100% a 10 mg/L contra *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus* (Elumalai *et al.*, 2017).

O óleo essencial de *H. pectinata* demonstrou potencial inseticida contra *Aedes aegypti* e a presença do composto óxido de cariofileno pode ter tido participação neste efeito (Silva *et al.*, 2008). Também foi eficiente no controle de formigas cortadeiras *Acromyrmex balzani* Emery e *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Feitosa-Alcantara *et al.*, 2017). Já o óleo essencial de *H. martiusii* possui efeito inseticida pronunciado contra larvas *Aedes aegypti* e *Bemisia argentifolii* (praga da mosca-branca) e *Culex quinquefasciatus* (Araújo *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2005). Outros ensaios com espécies *Hyptis* ssp. podem ser observados na tabela 2.11.

Quanto à atividade de repelência, praticamente, quase todos os estudos envolvem óleo essencial de *H. suaveolens* com resultados positivos para representantes do gênero *Armigeres*, *Culex* e *Aedes* (Vongsombath *et al.*, 2012; Conti *et al.*, 2012) além das espécies *Anopheles gambiae* (Abagli *et al.* 2012), *Sitophilus granarius* (Conti *et al.* 2011; Benelli *et al.* 2012), *Amblygomma cajennense* (Soares *et al.*, 2010). O óleo essencial de *H. mutabilis* também foi capaz de repelir mosquitos *Aedes aegypti*.

Para a atividade acaricida identificamos estudos com óleo essencial e o composto isolado cadina-4,10(15)-dien-3-one pertencentes a espécie *H. verticillata* e direcionados contra as fêmeas adultas ingurgitadas de *Boophilus microplus*. Os estudos revelaram atividade de quimiosterilização contra este carrapato bovino de relevante importância econômica.

2.3.1.2.7 Atividade Anti-inflamatória, antiedematogênica e vasorelaxante

A atividade farmacológica de extratos, óleo essencial e compostos isolados de *Hyptis* spp. foram investigados visando identificar suas potencialidades anti-inflamatórias, antiedematogênicas e vasorelaxantes (Tabela 2.12) .

O extrato clorofórmico de *H. albida* mostrou-se um potente inibidor da liberação de mediadores inflamatórios de macrófagos em camundongos e suprimiu a sobre-expressão de genes relevantes (Miranda *et al.*, 2013). O composto ácido rosmarínico proveniente de *H. verticillata*, foi analisado por meio do modelo da membrana cório-alantoide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM) e apresentou efeitos estabilizadores significativos nos capilares (Kuhnt *et al.*,1995). Já o suaveolol e o suaveolato de metilo isolados de *H. suaveolens* mostraram quase a mesma atividade anti-inflamatória tópica dependente da dose (apenas duas a três vezes inferior) que o fármaco de referência indometacina (Grassi *et al.*, 2006). O óleo essencial de *H. pectinata* inibiu o processo inflamatório em roedores, induzido pela injeção subcutânea de carragenina, reduzindo a migração celular, o volume de exsudato, a concentração de proteínas e os mediadores inflamatórios (óxido nítrico, prostaglandina E2, IL-6 e TNF- α) produzidos na bolsa (Raymundo *et al.* 2011). Já os extratos etanólicos de *H. umbrosa* mostraram potencial na redução da disseminação dos processos inflamatórios.

A ação antiedematogênica foi registrada na espécie *H. pectinata* onde o extrato aquoso de suas folhas foi usado para o edema de pata de rato induzido por carragenina e amostras de Malhada dos Bois e São Francisco tiveram um forte efeito, reduzindo o edema em 19,6% e 15,4%, respectivamente (Arrigoni-Blank *et al.* 2005). Para a ação vasorelaxante, o extrato de diclorometano de *H. fruticosa* garantiu bons resultados com efeito vasorelaxante na artéria mesentérica superior de rato por meio de uma via independente do endotélio, possivelmente devido à inibição do influxo de Ca^{2+} em canais de Ca^{2+} operados por voltagem.

2.3.1.2.8 Atividade antidiabética, antidepressora, moluscicida, espamolítica e hipotensão associada à taquicardia

Conforme a literatura, *H. suaveolens* pode ser uma grande aliada na regulação dos níveis de glicose no sangue. Prova disso é o estudo desenvolvido com o extrato etanólico aquoso de *H. suaveolens*

que resultou em uma redução significativa na glicose do sangue de ratos diabéticos comprovando sua significativa atividade antihiperlipidêmica (Mishra *et al.*, 2011). Um outro estudo bem atual reforçou o potencial desta espécie para atividade antidiabética ao utilizar o extrato etanólico aquoso de *H. suaveolens* e suas frações para avaliação da captação de glicose pelo diafragma isolado de rato que foi significativa e dependente da dose, sendo máxima para o extrato etanólico aquoso e sua fração éter de petróleo (Begum *et al.*, 2016a). Begum e colaboradores (2016a) ressaltaram que atividade antidiabética para espécie *H. suaveolens* foi comparável à insulina padrão.

Estudos sobre outras atividades biológicas foram desenvolvidos em menor número e estão representados na tabela 2.13. Seriam a atividade antidepressiva (*H. pectinata*), a atividade moluscicida (*H. suaveolens*), a atividade espasmolítica (*H. macrostachys*) e a atividade de hipotensão associada à taquicardia (*H. fruticosa*).

2.3.1.3 Toxicidade

As plantas medicinais vem sendo amplamente utilizadas em todo mundo para fins medicinais. As espécies *Hyptis* não são diferentes, sendo utilizadas para tratamento de inúmeras enfermidades e, inclusive, para alimentação. Todavia, é preciso atentar-se para a falta de informação da população sobre a fitoquímica, farmacologia e toxicologia destas plantas que podem resultar em problemas de intoxicação com comprometimento da saúde humana (Suzery *et al.*, 2017; Bezerra *et al.*, 2017). Neste sentido, pesquisas que avaliem a toxicidade de extratos, óleos essenciais e compostos isolados se tornam extremamente relevantes.

Testes toxicológicos foram desenvolvidos com algumas espécies de *Hyptis* e estão descritos na tabela 2.14. Extratos aquosos de folhas de *H. fruticosa* não apresentaram toxicidade aguda nas doses de 1, 3 e 5 g/kg quando administrados oralmente em camundongos (Silva *et al.*, 2006), assim como o seu óleo essencial na dose de 5g/kg aplicados subcutaneamente em camundongos (Menezes *et al.*, 2007). O extrato espesso de *H. pectinata* aplicado via oral por sonda gástrica também foi considerado seguro ao não causar nenhuma complicação no fígado de camundongos (Suzery *et al.*, 2017).

O óleo essencial de partes aéreas de *H. rhomboidea*, *H. brevipes* e *H. suaveolens* mostraram toxicidade significativa com bioensaios com camarão de salmoura (Xu *et al.*, 2013). Bezerra e

colaboradores (2017) confirmaram a toxicidade do óleo essencial de *H. suaveolens* e a não toxicidade da infusão de suas folhas, ambos por bioensaios com *Artemia salina* e *Drosophila melanogaster*.

2.3.1.4 Utilização como alimento

A importância econômica de plantas do gênero *Hyptis* é crescente com base em seu potencial em fornecer óleos essenciais, adequar-se a fins paisagísticos e valer-se ao uso culinário (Santos *et al.*, 2008). Para o uso culinário, destaca-se o uso de sementes da espécie *H. suaveolens*, de maneira muito limitada, como fonte de alimento (Aguirre *et al.*, 2012; Mueller *et al.*, 2016). Conforme Aguirre *et al.*, 2012, essas sementes podem ter potencial para uso na produção de alimentos de alta qualidade devido às suas propriedades nutricionais com o bom suprimento de quase todos os aminoácidos essenciais para os diferentes grupos etários. Seus estudos constataram um teor de proteína de 13,9% com base no peso seco, sendo destes, 39% de globulinas, 36% de glutelinas, 24% de albuminas e 1% de prolaminas (Aguirre *et al.*, 2012).

Bojórquez-Velázquez e colaboradores (2016) se propuseram a avaliar as propriedades bioquímicas e físico-químicas das globulinas que representam a principal fração proteica da semente de *H. suaveolens*. Eles constataram que a globulina Hs11S é constituída por quatro diferentes tipos de monômeros, montados em vários graus oligoméricos e que seus resultados podem ser empregados na indústria para o desenvolvimento de alimentos convencionais ou novos baseados em proteínas de *H. suaveolens* (Bojórquez-Velázquez *et al.*, 2016).

Gowda (1984), investigou o revestimento de polissacarídeo transparente da semente da planta *H. suaveolens* que, em presença de água, formava uma mucilagem. O fracionamento dessa mucilagem culminou em um polissacarídeo neutro composto de D- manose, D- galactose e D- glicose nas razões molares 1,0: 4,5: 7,5 e em um polissacarídeo ácido composto por de L-fucose, D-xilose e 4-Ácido-O-metil-D-glucurônico nas razões molares 1,0:2,5:1,1 (Gowda, 1984). Já Mueller e colaboradores (2016) utilizaram os isolados poli-e oligossacarídeos das mucilagens de sementes desta espécie para determinação do potencial prebiótico, investigando o impacto da separação em frações ácidas e neutras e o efeito do tratamento enzimático (Mueller *et al.*, 2016). A fração neutra aumentou o crescimento de várias cepas probióticas de forma moderada, mas significativa, podendo servir como uma nova fonte prebiótica com efeito tardio, mas mais duradouro (Mueller *et al.*, 2016).

Ainda quanto à questão alimentar, outros estudos direcionaram-se para a capacidade de *Hyptis* proteger produtos alimentares da infestação de pragas que causam perdas irreparáveis. Fato que acontece muito para produtos que após colheita são armazenados e ficam sujeitos às condições climáticas e ambientais favoráveis ao crescimento e proliferação de diversas pragas de armazenamento, tais como os fungos. Os fungos acarretam a deterioração dos alimentos e, ainda, podem secretar micotoxinas perigosas para a saúde humana (Jaya *et al.*, 2011). Jaya e colaboradores (2011) exploraram a eficácia do óleo essencial de *H. suaveolens* como agente antifúngico e antiaflatoxigênico contra alguns fungos de armazenamento e a cepa toxigênica de *Aspergillus flavus*. O óleo essencial reprimiu completamente a síntese de aflatoxina B1 de maneira dependente da concentração e exibiu notável proteção (> 80%) as amostras de trigo armazenado contra a infestação por fungos podendo, portanto, ser recomendado como novo antifúngico e supressor da aflatoxina B1 (Jaya *et al.*, 2011).

Tabela 2.5 – Atividade antimicrobiana de biomassa seca, extratos e compostos isolados de plantas do gênero *Hyptis*.

Espécie	Autor/Ano/País	Parte da planta	Tipo de extrato	Atividade biológica	Modelo usado	Resultados
<i>Hyptis crenata</i>	Violante <i>et al.</i> (2012) - Brasil	Planta inteira	Etanólico e frações de hexano, diclorometano, acetato de etilo e etanol-água	Antibacteriana e antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> com microdiluição em caldo	Extrato bruto ativo contra dois fungos, <i>C. krusei</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i> (valores de CIM de 125 mg/ml); fração hexano ativo contra <i>Cryptococcus neoformans</i> (CIM = 125 mg/ml); fração diclorometano ativo contra <i>S. aureus</i> (62,5 mg/ml) e <i>Enterococcus faecalis</i> ; fração acetato de etilo ativo contra <i>S. aureus</i> (31,3mg/ml).
<i>Hyptis atrorubens</i>	Abedini <i>et al.</i> (2013) - França	Hastes e folhas	Éter de petróleo, cloreto de metileno, metanol e hidrometanólicos	Antibacteriana	Ensaio <i>in vitro</i> por diluição em série usando placas de microtitulação de 96 poços para determinar a CIM dos compostos puros contra bactérias sensíveis	Foi ativo contra 29 microorganismos com melhor atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas. A bioautografia possibilitou o isolamento e a identificação de quatro compostos antibacterianos dessa planta: ácido rosmarinico, rosmarinato de metila, isoquercetina e hiperosídeo. A melhor atividade inibitória e bactericida foi encontrada para o rosmarinato de metila (0,3 mg/ml). Mesmo assim, o poder bactericida do ácido rosmarinico foi muito mais rápido no estudo do tempo de morte. Efeitos sinérgicos foram encontrados ao combinar os compostos ativos.
<i>Hyptis capitata</i>	Kusuma <i>et al.</i> (2014) - Indonésia	Raiz	Extrato n- hexano, acetato de etilo e etanol	Antibacteriana e antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> com difusão em disco em ágar	Boa atividade contra <i>P. acnes</i> a 25-400 µg/poco dos extratos testados. Os extratos de n- hexano e etanol de <i>H. capitata</i> mostraram mais atividade contra <i>C. albicans</i> do que outras em 25-400 µg/poco dos extratos testados.
<i>Hyptis fasciculata</i>	Isobe <i>et al.</i> (2006) - Brasil	Partes aéreas	Compostos isolados de extrato (cirsilíneo, cirsimarítina, acetato de aurantiâmida, benzoato de aurantiâmida, methoxinepetaefolina)	Antibacteriana	Ensaio <i>in vitro</i> com determinação do IC90 (concentração de inibição do crescimento em 90%).	Os flavonoides cirsilíneo e cirsimarítina apresentaram atividades positivas contra <i>Helicobacter pylori</i> . O composto cirsilíneo exibiu uma potente atividade anti- <i>Helicobacter pylori</i> , no entanto, exibiu apenas atividade fraca contra <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella enteritidis</i> . O composto cirsimarítina exibiu potente anti- <i>H. pylori</i> , tendo seletividade para outros microorganismos testados.
<i>Hyptis lantanifolia</i>	Matsuse <i>et al.</i> (1999) - Panamá	Parte aérea	Extrato aquoso	Antivirótica	Ensaio <i>in vitro</i> quanto à inibição de efeitos citopáticos induzidos pelo HIV, transcriptase reversa do HIV (RT) e enzimas HIV-protease (PR)	Potente inibidor do HIV-RT (IC 50: 6-8 µg/ml).
<i>Hyptis martusii</i>	Coutinho <i>et al.</i> (2010) - Brasil	Parte aérea	Extrato etanólico (EE)	Antibacteriana	Ensaio <i>in vitro</i> com clorpromazina utilizando microdiluição	Apresentam atividade modificadora de resistência com um efeito potenciador entre este extrato e os aminoglicosídeos e efeito potenciador da clorpromazina com kanamicina. Combinações de aminoglicosídeos e EE demonstrou efeito aditivo com kanamicina e gentamicina.
<i>Hyptis martusii</i>	Coutinho <i>et al.</i> (2008) - Brasil	Folhas	Extrato etanólico	Antibacteriana	Ensaio <i>in vitro</i> com difusão em meio sólido utilizando poços de ágar	O crescimento das bactérias <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> foi inibido pelo extrato. Os diâmetros das zonas de inibição variaram de 13 - 20 mm. Os valores da CIM e CBM variaram de 128 a > 1024 mg/ml e 256 a > 1024 mg/ml, respectivamente. Quando comparado com outros antibióticos como meticilina e gentamicina, o extrato foi mais efetivo.
<i>Hyptis martusii</i>	Coutinho <i>et al.</i> (2009) - Brasil	Parte aérea	Extrato etanólico	Antibacteriana	Ensaio <i>in vitro</i> com microdiluição.	O crescimento de dois isolados de <i>Escherichia coli</i> testados foi inibido pelo extrato. Os valores mínimos de concentração bactericida e inibitória (CIM e CBM) variaram entre 512 e >1024 µg/ml para <i>E. coli</i> /27 e 1024 e >1024 µg/ml para <i>E. coli</i> /ATCC8539, respectivamente. Foi demonstrado um sinergismo entre este extrato e todos os aminoglicosídeos ensaiados.

Tabela 2.5 – Atividade antimicrobiana de biomassa seca, extratos e compostos isolados de plantas do gênero *Hyptis* (continuação)

<i>Hyptis martiusii</i>	Santos <i>et al.</i> (2013) – Brasil	Folhas	Extrato etanólico	Antiepimastigota e antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> com clone CL-B5 de <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> e <i>Candida krusei</i>	A concentração efetiva capaz de matar 50% dos parasitas epimastigotas (IC ₅₀) foi de 4606 µg/ml. A concentração inibitória mínima antifúngica (CIM) foi ≤ 1024µg/ml. O metronidazol apresentou potencialização do seu efeito antifúngico quando associado ao extrato.
<i>Hyptis ovalifolia</i>	Hasimoto <i>et al.</i> (2002) – Brasil	Folhas	Extratos etanólicos	Antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> com 30 isolados de dermatófitos e extratos a 1000 µg/ml.	<i>H. ovalifolia</i> inibiu completamente o crescimento dos 30 dermatófitos testados na concentração de 1000 µg/ml. A 250 µg/ml inibiu 25 dos 30 dermatófitos. As estirpes de <i>Trichophyton rubrum</i> foram as mais susceptíveis, uma vez que 7 dos 10 isolados foram inibidos nesta concentração.
<i>Hyptis ovalifolia</i>	Souza <i>et al.</i> (2003) – Brasil	Folhas	Frações aquosa, hexana e metanólica	Antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> por teste de susceptibilidade contra 60 cepas de dermatófitos.	Na concentração de 1000 µg/ml mostrou que a fração aquosa inibiu o crescimento de 40% (24/60), a fração metanólica de 90% (54/60) e o hexano fração de 51,7% (31/60) de 60 dermatófitos testados. <i>T. rubrum</i> foi a espécie mais suscetível à maioria das frações testadas com exceção, da fração aquosa.
<i>Hyptis pectinata</i>	De Queiroz <i>et al.</i> (2014) – Brasil	Partes aéreas	Extrato aquoso	Antileishmanial	Ensaio <i>in vitro</i> com uso macrófagos murinos da linha celular J774 (avaliar replicação celular) e modelo de infecção em uma tampa de vidro (avaliar estágios amastigote).	Atividade direta contra formas extracelulares a 100 µg/ml com inibição do crescimento em 81,9% quando comparados com promastigotas. Diminuíram significativamente o número de amastigotas a 10 µg/ml, inibindo o crescimento em 85,0% quando comparado com o controle.
<i>Hyptis pectinata</i>	Falcao <i>et al.</i> (2013) – Brasil	Folhas	O extrato de etanólico, as frações de hexano, acetato de etila e metanol: H ₂ O; e os compostos isolados	Antileishmanial	Ensaio <i>in vitro</i> com determinação do efeito máximo e o valor de IC ₅₀	O extrato de etanólico, as frações de hexano, acetato de etila e metanol: H ₂ O; e os compostos 1, 2 e 4 exibiram atividade antileishmanial. O composto 1 era tão potente quanto a pentamidina. Em contraste, os compostos 3, 5 e 7 não apresentaram atividade contra a forma promastigote de <i>L. braziliensis</i> abaixo de 100 µM. A atividade da fração de acetato de etila pode ser parcialmente atribuída aos compostos: isolados 1, 2 e 4.
<i>Hyptis spicigera</i>	Ladan <i>et al.</i> (2009) - Nigéria	Folhas	Extrato de hexano, éter dietílico, diclorometano, acetato de etila e metanol	Antibacteriana e antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> com cinco diferentes concentrações para determinação da concentração bacteriana mínima	Todos os extratos mostraram potência bactericida efetiva a 2,5 mg/ml. <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Candida albicans</i> apresentaram a maior resistência à potência bactericida dos extratos com a concentração bactericida mínima (CBM) elevada a 5 mg/ml.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Goly <i>et al.</i> , (2015) - Costa do Marfim	Folhas	Extratos de etanol a 70%	Antibacteriana	Ensaio <i>in vitro</i> com ágar e suspensão líquida com <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina (S. aureus Met-R), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente à ceftazidima e imipenem (P. aeruginosa Cefta / Imp-R), S. aureus ATCC 25923 e P. aeruginosa ATCC 27853	Atividade antibacteriana de extratos contra estirpes bacterianas multiresistentes (S. aureus MetR, S. aureus ATCC 25923, P. aeruginosa Ceft/Imp-R, P. aeruginosa ATCC 27853). O extrato foi mais ativo do que o seu óleo essencial. Após a extração do óleo essencial, o extrato de etanol a 70% teve uma atividade antibacteriana ainda maior.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Mandal <i>et al.</i> (2007) - Índia	Folhas	O vapor destilado, extrato de éter de petróleo e extrato de etanol	Antibacteriana e antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> de difusão em poço para rastrear os extratos quanto à atividade antimicrobiana	Exibi atividade antibacteriana e antifúngica de amplo espectro contra os organismos testados (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Helminthosporium oryzae</i>). Ele apresentou maior atividade antifúngica e antibacteriana contra <i>Aspergillus niger</i> e <i>Micrococcus luteus</i> , respectivamente.

Tabela 2.5 – Atividade antimicrobiana de biomassa seca, extratos e compostos isolados de plantas do gênero *Hyptis* (continuação)

<i>Hyptis suaveolens</i>	Satish <i>et al.</i> (2010) - Índia	Folhas	Extratos de Éter de petróleo, metanol e extratos aquosos	Antibacteriana e antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> por difusão em disco	O extrato de éter de petróleo foi mais eficaz contra <i>Escherichia coli</i> e <i>Serratia marcescens</i> e <i>Aspergillus flavus</i> , respectivamente, quando comparado a outros extratos.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Chukwujekwu <i>et al.</i> (2005) - Nigéria	Folhas	Extrato de éter de petróleo e composto isolado	Antiplasmódial	Ensaio <i>in vitro</i> usando uma cepa de <i>Plasmodium falciparum</i> sensível a cloroquina (D10) e determinação de viabilidade por lactato desidrogenase de plasmodium (pLDH).	O fracionamento guiado por bioatividade do extrato de éter de petróleo, levou ao isolamento de um endoperóxido diterpenoide de tipo abietano, 13 α -epi-dioabiet-8 (14)-en-18-ol, exibindo elevada atividade antiplasmodica (IC ₅₀ de 0,1 μ g/ml).
<i>Hyptis suaveolens</i>	Kothandan <i>et al.</i> (2014) - Índia	Folhas	Extratos aquoso e extrato etanólico	Antivirótica	Ensaio <i>in vitro</i> avaliado pela inibição do efeito citopático induzido pelo vírus.	Extratos aquoso e extrato etanólico aquoso de <i>Hyptis suaveolens</i> exibiram inibição parcial da cepa asiática do vírus chikungunya. De todas as três plantas testadas para atividade antiviral em ambas as linhagens do vírus chikungunya, o <i>Hyptis suaveolens</i> mostrou-se eficaz para a cepa asiática do vírus chikungunya.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Muthamli <i>et al.</i> (2018) - Índia	Folhas	Extrato metanólico	Antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> com síntese de nanopartículas de prata (AgNPs)	Os resultados revelaram que as AgNPs inibiram fortemente mais de 80% do biofilme formado por <i>Candida</i> spp. Além disso, as AgNPs também reduziram a transição levedura-hipófise, a biossíntese do exopolissacarídeo, a produção de aspartilase proteica secretada.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Salini <i>et al.</i> (2015) - Índia	Folhas	Extrato hexânico	Antibacteriana	Ensaio <i>in vitro</i> de diluição em caldo padrão e de cristal estático.	Mostrou atividade anti-QS contra a cepa biossensora <i>Chromobacterium violaceum</i> (ATCC12472) e inibiu a formação de biofilme por uropatógenos como <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Serratia marcescens</i> .
<i>Hyptis verticillata</i>	Kuhnt <i>et al.</i> (1995) - México	Partes aéreas	Extrato bruto e compostos isolados ((R)-5-hidroxipirrolidin-2-ona, ácido rosmarinico e desidropodoflotoxina) e óleo essencial.	Antibacteriana	Ensaio <i>in vitro</i> com difusão em ágar.	O extrato bruto foi notável contra <i>Escherichia coli</i> e ativo contra <i>Staphylococcus aureus</i> . A desidropodoflotoxina mostrou atividade significativa contra <i>B. subtilis</i> . O ácido rosmarinico mostrou efeitos notáveis contra todas as bactérias testadas, sugerindo um efeito inespecífico.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Krishnamurthy <i>et al.</i> (2008) - Índia	Folhas	Pó de folhas	Antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> onde a semente de soja foi tratada com pó de folhas e armazenada em condições ambientais por meses para avaliar a incidência de <i>Aspergillus flavus</i> e porcentagem de germinação da semente.	Pó de folhas de <i>H. suaveolens</i> restringiram a frequência de <i>A. flavus</i> . Todos os tratamentos mantiveram alta porcentagem de germinação das sementes de soja ao longo de um período de armazenamento de 6 meses.

Tabela 2.6 – Atividade antimicrobiana do óleo essencial de plantas do gênero *Hyptis*.

Espécie	Autor/ Ano/País	Parte da planta	Tipo de extrato	Atividade biológica	Modelo usado	Resultados
<i>Hyptis atrorubens</i>	Kerdudo <i>et al.</i> (2016) - França	Parte aérea	Óleo essencial	Antibacteriana e antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> com 08 cepas cultivadas em caldo nutriente líquido	Atividades antibacterianas e antifúngicas foram observadas contra <i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Bacillus cereus</i> a 0,5%.
<i>Hyptis colombiana</i>	Flores <i>et al.</i> (2014) - Venezuela	Folhas	Óleo essencial	Antibacteriana	Ensaio <i>in vitro</i> pelo método de Kirby-Bauer com determinação da concentração inibitória mínima (CIM).	O óleo foi duas vezes mais ativo contra <i>Staphylococcus aureus</i> em outubro de 2006 (CIM 10 mg/ml) quando a proporção de β -cariofileno para germacrene D foi de 0,48, em relação a fevereiro de 2005 (CIM 20 mg/ml) quando o óleo continha uma proporção de β -cariofileno para germacrene D de 1,10.
<i>Hyptis fruticosa</i> e <i>Hyptis pectinata</i>	Souza <i>et al.</i> (2017) - Brasil	Folhas	Óleo essencial	Tripanocida	Ensaio <i>in vitro</i> contra epóxi e tripomastigotas por microscopia óptica e citotoxicidade para células de mamíferos por MTT.	Todos os óleos testados apresentaram efeito inibitório sobre o crescimento e a sobrevivência de todas as formas de <i>Trypanosoma cruzi</i> e moderada citotoxicidade para as células de mamíferos (100 <CC50 <500 μ g/ml).
<i>Hyptis marrubiolides</i>	Silva <i>et al.</i> (2012) - Brasil	Partes aérea	Óleo essencial	Antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> para avaliar os efeitos dos óleos sobre a germinação de esporos, o crescimento micelial e a produção e viabilidade de conídias de <i>Colletotrichum frunccatum</i> .	Os óleos inibiram a germinação e produção de conídios, bem como o crescimento de <i>C. frunccatum</i> . Em concentrações \geq 1%, a eficácia dos óleos contra a antracnose da soja foi superior ou, pelo menos, comparável com a do fungicida carbendazim. A viabilidade dos conídios e a germinação de sementes de soja não foram afetadas por nenhum dos tratamentos com óleos essenciais.
<i>Hyptis marrubiolides</i>	Silva <i>et al.</i> (2014) - Brasil	Parte aérea	Óleo essencial	Antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> com avaliação da inibição da germinação de uredinósporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> com óleo aplicado no intervalo de concentração de 0,05 - 2%. Microscopia eletrônica de varredura foi utilizado para investigar o efeito dos óleos essenciais sobre a morfologia dos uredinósporos do fungo.	O tratamento em todas as concentrações testadas levou à inibição total da germinação de esporos <i>in vitro</i> .
<i>Hyptis martusii</i>	Oliveira <i>et al.</i> (2014) - Brasil	Folhas	Óleo essencial	Antibacteriana	Ensaio <i>in vitro</i> microdiluição direta (MIC) e gasosa (MID) para vários microorganismos patogênicos.	O óleo foi capaz de inibir o crescimento bacteriano em <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , cepas ATCC e <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> resistentes a múltiplos medicamentos. Os resultados deste estudo mostraram atividade antibacteriana para a estirpe padrão (ATCC) de todas as bactérias com CIM de 512 μ g/ml, exceto <i>B. cereus</i> , onde CIM 256 μ g/ml e <i>S. aureus</i> SA358 onde CIM \geq 1024 μ g/ml. Os resultados das MICs foram mais eficazes contra <i>E. coli</i> resistente a múltiplos fármacos com CIM de 64 μ g/ml que o ATCC2592 512 μ g/ml.
<i>Hyptis martusii</i>	Andrade <i>et al.</i> (2017) - Brasil	Folhas	Óleo essencial	Antibacteriana	Ensaio <i>in vitro</i> pela técnica de microdiluição.	O óleo essencial por si só demonstrou um efeito antibacteriano e modulatório contra o <i>Staphylococcus aureus</i> e a estirpe Gram negativa, respectivamente.

Tabela 2.6 – Atividade antimicrobiana do óleo essencial de plantas do gênero *Hyptis* (continuação)

<i>Hyptis martiusii</i>	De Figueiró <i>et al.</i> (2018) – Brasil	Folhas	Óleo essencial	Antibacteriana	Ensaio <i>in vitro</i> com utilização da CIM como forma de avaliação da modulação usando uma inoculação de 100 microlitros de cada estirpe bacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	O óleo essencial apresenta sinergismo só em associação com os antibióticos gentamicina e imipenem contra as bactérias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Escherichia coli</i> .
<i>Hyptis mutabilis</i>	Zapata <i>et al.</i> (2009) – Colômbia	Folhas	Óleo essencial	Antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> contra <i>Candida parapsilosis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i> , seguindo as técnicas padrão EUCAST e CLSI M38-A para leveduras e fungos filamentosos, respectivamente.	O óleo da planta de <i>H. mutabilis</i> O1 foi moderadamente ativo com <i>A. fumigatus</i> (CIM = 396,8 µg/ml). O estudo demonstrava atividade do óleo de <i>H. mutabilis</i> contra o fungo ambiental <i>A. fumigatus</i> .
<i>Hyptis mutabilis</i>	Oliva <i>et al.</i> (2005) – Argentina	Folhas	Óleo essencial	Antibacteriana e antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> com oito microorganismos, incluindo bactéria Gram-positiva, e Gram-negativos pelo método de difusão em poço. Testes antifúngicos com determinação da susceptibilidade <i>in vitro</i> foram realizados utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> e <i>Mucor</i> sp.	O óleo essencial extraído de <i>H. mutabilis</i> foi ineficaz contra as cepas bacterianas gram negativas, mas mostrou alguma inibição do crescimento de <i>Proteus mirabilis</i> . O crescimento de bactérias Gram-positivas foi inibido pelo óleo essencial de <i>H. mutabilis</i> , embora o óleo fosse ineficaz contra <i>Staphylococcus epidermidis</i> . <i>Mucor</i> sp. foi mais sensível aos óleos de <i>H. mutabilis</i> do que <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Fusarium moniliforme</i> .
<i>Hyptis mutabilis</i>	Cunha <i>et al.</i> (2017) – Brasil	Folhas	Óleo essencial (OE)	Antiprotozoa	Ensaio <i>in vivo</i> com avaliação de infecções em peixes pelo parasita <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> (ich). Efeitos nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos do bagre prateado, <i>Rhamdia quelen</i> , expostos às mesmas amostras também foram avaliados.	OE e (-)-globulol aumentaram a sobrevivência de peixes infectados com ich e alteraram certos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Após 4 dias, os níveis de hematócrito, eritrócitos e leucócitos aumentaram significativamente em animais saudáveis expostos a OE. A exposição ao (-)-globulol aumentou apenas o número de leucócitos. Não foram detectadas diferenças significativas em parâmetros imunológicos inespecíficos quando os grupos tratados foram comparados aos controles, mas a leucocitose observada em animais saudáveis tratados com OE e globulol indica que OE e (-)-globulol aumentaram a imunidade inata nesses peixes. Um efeito antiparasitário <i>in vitro</i> foi observado em ambas as amostras.
<i>Hyptis ovalifolia</i>	Souza <i>et al.</i> (2003) - Brasil	Folhas	Óleo essencial	Antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> por teste de susceptibilidade contra 60 cepas de dermatófitos: 10 cepas de <i>Microsporium canis</i> , 10 de <i>M. gypseum</i> , 20 de <i>Trichophyton rubrum</i> e 20 de <i>T. mentagrophytes</i> .	O óleo essencial inibiu 100% de 60 dermatófitos testados na concentração de 1000 µg/ml. Dois isolados de <i>T. rubrum</i> foram inibidos pelo óleo essencial a 7,8 µg/ml. O óleo essencial, mostrou inibição do crescimento para <i>T. mentagrophytes</i> somente em alta concentração.
<i>Hyptis ovalifolia</i>	Oliveira <i>et al.</i> (2004) - Brasil	Folhas	Óleo essencial e composto isolado ((R)-6-[(2S)-1-heptenil]-5,6-dihidro-2H-pirran-2-ona	Antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> contra 60 cepas de quatro dermatófitos pelo método de diluição em ágar.	O óleo e o composto exibiram forte atividade contra quatro fungos dermatófitos <i>Microsporium canis</i> , <i>Microsporium gypseum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> e <i>Trichophyton rubrum</i> (um total de 60 cepas) com uma concentração inibitória mínima observada na faixa de 125-7,8 mg µl ⁻¹ .

Tabela 2.6 – Atividade antimicrobiana do óleo essencial de plantas do gênero *Hyptis* (continuação)

<i>Hyptis pectinata</i>	Santos <i>et al.</i> (2008) - Brasil	Folhas	Óleo essencial	Antibacteriana e antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> usando bactérias Gram (+) e Gram (-) e cepas padrão de levedura para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), concentração mínima (CMM), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM).	É mais eficaz contra leveduras e bactérias Gram (+). Ele só pode inibir Gram-negativos em altas concentrações. O óleo essencial mostra ação microbicida contra bactérias Gram (+), no entanto, no caso de leveduras, pode ser considerado fungicida ou fungistático, dependendo da dose ou da espécie.
<i>Hyptis pectinata</i>	Nascimento <i>et al.</i> (2008) - Brasil	Folhas	Óleo essencial	Antibacteriana	Ensaio <i>in vitro</i> pelo método de difusão em agar e microdiluição com várias linhagens de <i>Streptococcus mutans</i>	Considerável efeito inibitório contra nove isolados clínicos de <i>S. mutans</i> e duas estirpes ATCC (10449 e 27175), com concentrações mínimas inibitórias e bactericidas de 200µg/ml. Os dados obtidos confirmaram o melhor efeito inibitório contra <i>S. mutans</i> quando se utilizaram os diluentes Tween 20, Tween 80, dimetilsulfóxido e propileno glicol, embora o Tween 80 pareça ser mais adequado para a emulsificação.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Goly <i>et al.</i> (2015) - Costa do Marfim	Folhas	Óleos essenciais	Antibacteriana	Ensaio <i>in vitro</i> em duas linhagens bacterianas multirresistente com testes em agar e suspensão líquida. As cepas utilizadas foram <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilina (S. aureus Met-R), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes à ceftazidima e imipenem (P. aeruginosa Cefta / Imp-R), cepas citadas de S. aureus ATCC 25923 e P. aeruginosa ATCC 27853	Significativa atividade contra estirpes bacterianas multirresistentes (S. aureus Métr, S. aureus ATCC 25923, P. aeruginosa Ceft/Imp-R, P. aeruginosa ATCC 27853). O extrato de etanol a 70% de <i>Hyptis suaveolens</i> foi mais ativo do que o seu óleo essencial.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Joy <i>et al.</i> (2008) - Índia	Folhas	Óleo essencial	Antibacteriana	Ensaio <i>in vitro</i> com bactérias gram + (<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>) e gram- (<i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>) pelo método de difusão em agar.	Em comparação com as drogas padrão, a saber, gentamicina e cloranfenicol, o óleo apresentou efeito inibitório muito significativo contra <i>S. aureus</i> e um efeito consideravelmente bom sobre <i>E. coli</i> . Além disso, verificou-se que o potencial inibidor do óleo contra <i>Proteus vulgaris</i> foi menor comparado com outros organismos. Todas as cepas bacterianas demonstraram algum grau de sensibilidade ao óleo volátil da planta. Curiosamente, <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> eram mais sensíveis ao óleo. As CIMs variaram de 1,56 a 6,25 µl/ml, onde como <i>B. subtilis</i> e <i>P. aeruginosa</i> eram menos sensíveis (as CIM variaram de 16,67 a 25 µl/ml).
<i>Hyptis suaveolens</i>	Singh e Handique (1997) – Índia	Folhas	Óleo essencial	Antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> com combinação de óleo de <i>Hyptis suaveolens</i> com <i>Trichoderma harzianum</i> para aumentar a eficácia da ação antifúngica.	O tratamento com o óleo reduziu drasticamente a germinação de ascósporos de <i>Schrotinia sclerotiorum</i> . O óleo em combinação com o fungo antagonista <i>Trichoderma harzianum</i> controlou as doenças do knolkhol (Brassica caulorapa Pasq.) causada por <i>S. sclerotiorum</i> . O óleo parece inibir o crescimento fúngico, mas não destrói a viabilidade dos três fungos esclerotípagos.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Khonkam <i>et al.</i> (2015) – Tailândia	Parte aérea	Óleo essencial	Antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> com dermatófitos (<i>Trichophyton mentagrophyte</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Microsporum gypseum</i>) e <i>Candida albican</i> usando o método de difusão em disco de agar.	O gel CMMS à base de microemulsões de óleo de <i>H. suaveolens</i> carregadas com clotrimazol apresentou atividade antifúngica potente contra todos os dermatófitos estudados e <i>Candida albican</i> com maior área de inibição do que o gel CMMS à base de microemulsões de óleo de <i>H. suaveolens</i> ou óleo de <i>H. suaveolens</i> e creme comercial de clotrimazol.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Pandey e Dubey (1994) – Índia	Folhas	Óleo essencial	Antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> com tratamento de sementes de tomate var. "Money Maker" com óleos da <i>Hyptis</i> .	Controla a doença de amorteimento do tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>) até 83, 67 no solo infectado com <i>Fythyum aphanidermatum</i> e 86, 71% em solos infectados com <i>P. debaryanum</i> . O óleo apresentou fungosidade seletiva e não era fitotóxico.

Tabela 2.6 – Atividade antimicrobiana do óleo essencial de plantas do gênero *Hyptis* (continuação)

<i>Hyptis suaveolens</i>	Krishnamurthy <i>et al.</i> (2005) – Índia	Folhas	Pó de folhas	Antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> onde a semente de soja foi tratada com pó de folhas e armazenada em condições ambientais por meses para depois avaliar a incidência de <i>Aspergillus flavus</i> e porcentagem de germinação da semente.	Pó de folhas de <i>H. suaveolens</i> restringiram a frequência de <i>A. Flavus</i> . Todos os tratamentos mantiveram alta porcentagem de germinação das sementes de soja ao longo de um período de armazenamento de 6 meses.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Okonogi <i>et al.</i> (2005) – Tailândia	Parte aérea	Óleo essencial	Antibacteriana e antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> com uso de vários tipos de bactérias e fungos que causaram doenças dermatológicas pelo método de diluição em ágar.	O óleo essencial de <i>H. suaveolens</i> apresentou atividade inibitória significativa contra as bactérias (<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213), <i>S. aureus</i> (NP3HC), <i>S. aureus</i> (PCD), <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922), <i>Streptococcus pyogenes</i> (P31), <i>S. pyogenes</i> (P183)) e fungos (<i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>T. rubrum</i>). A inibição foi mais forte para bactérias gram positivas que gram negativas. Embora o poço menor tenha sido usado, o diâmetro das zonas de inibição contra os fungos, particularmente <i>T. rubrum</i> foi quase tão grande quanto o das bactérias nos poços maiores.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Iwu <i>et al.</i> (1990) – Nigéria	Partes aéreas	Óleo essencial	Antibacteriana e antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> por técnicas de difusão em ágar	Boa atividade antimicrobiana contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Yersinia enterocolitica</i> . A maior zona de inibição foi registrada contra <i>Staphylococcus aureus</i> e com uma concentração inibitória mínima (CIM) de 30 µg/ml, o óleo pode ser incorporado na preparação tópica para o tratamento de infecções por <i>Staphylococcus</i> ou usado como anti-séptico. O óleo também mostrou alguma atividade contra as leveduras e os fungos testados, embora, quando testados contra mentogríftos de <i>Trichophyton</i> , o CIM fosse maior que 100 µg/ml.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Asekun <i>et al.</i> (1999) – Nigéria	Folhas	Óleo essencial	Antibacteriana e antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> pelo método de difusão em ágar	Atividade inibitória significativa contra duas bactérias Gram-positivas e quatro gram negativas e também foi muito ativa contra o fungo <i>Candida albicans</i> .
<i>Hyptis suaveolens</i>	Tesch <i>et al.</i> (2015) – Venezuela	Folhas e flores	Óleo essencial	Antibacteriana	Ensaio <i>in vitro</i> pelo método de difusão em disco.	Ambos os óleos essenciais (folhas e flores) inibiram o desenvolvimento de <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Salmonella typhi</i> , com uma concentração inibitória mínima (MIC) que variou entre 300 µL/ml e 450 µL/ml.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Moreira <i>et al.</i> (2010) – Brasil	Folhas	Óleo essencial	Antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> por macrodiluição em caldo.	O óleo essencial revelou uma interessante propriedade anti- <i>Aspergillus</i> caracterizada por uma CIM e CFM de 40 e 80 µl/ml, respectivamente. O óleo a 80 e 40 µl/ml inibiu fortemente o crescimento micelial de <i>A. fumigatus</i> e <i>A. parasiticus</i> ao longo de 14 dias. Além disso, a 10 e 20 µl/ml o óleo foi capaz de causar alterações morfológicas em <i>A. flavus</i> como diminuição da conidição, vazamento de citoplasma, perda de pigmentação e estrutura celular interrompida, sugerindo degeneração de parede fúngica.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Bachheti <i>et al.</i> (2015) – Índia	Semente	Óleo de semente	Antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica)	Ensaio <i>in vitro</i> pelo método de difusão de disco e método de diluição em caldo.	O óleo (1 mg/ml a 0,125 mg/ml) foi prejudicial ao crescimento de cepas bacterianas e fúngicas. <i>Salmonella typhi</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Candida tropicalis</i> foram suscetíveis a menor concentração (0,125%). <i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella flexnerii</i> e <i>Vibrio vulnificus</i> eram sensíveis somente em concentrações mais altas (0,5 e 1%) testadas. A bioatividade de 1 mg/ml de óleo de semente contra <i>C. tropicalis</i> foi comparável ao controle de Fluconazol (25 µg). As concentrações mínimas de inibição (CIM) foram de 0,125 mg/ml para <i>S. typhi</i> e <i>P. aeruginosa</i> , <i>L. plantarum</i> e <i>C. tropicalis</i> , enquanto era 0,2 mg/ml para <i>L. leishmanii</i> , <i>S. aureus</i> e <i>C. albicans</i> .

Tabela 2.6 – Atividade antimicrobiana do óleo essencial de plantas do gênero *Hyptis* (continuação)

<i>Hyptis suaveolens</i>	Malele <i>et al.</i> (2003) - Tanzania	Folhas	Óleo essencial	Antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> pela determinação da susceptibilidade.	Forte atividade antifúngica contra <i>Mucor</i> sp. e <i>Fusarium moniliforme</i> . O óleo apresentou atividade antimicrobiana significativa contra <i>Mucor</i> sp. quando comparado ao cetoconazol.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Java <i>et al.</i> (2011) - Índia	Folhas	Óleo essencial (OE)	Antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> para determinação da CIM e CFM contra a cepa toxigênica de <i>Aspergillus flavus</i> e ensaio <i>in vivo</i> por fumigação.	O OE de <i>C. aromaticus</i> foi encontrado para ser mais eficaz exibindo CIM e CFM em 0,1 µl/ml ⁻¹ . O óleo também estabilizou completamente a síntese de aflatoxina B1 de maneira dependente da concentração. Além disso, a fumigação de amostras de trigo armazenadas com OEs exibiu proteção notável (> 80%) da infestação por fungos, mostrando sua eficácia durante as condições de armazenamento <i>in vivo</i> .
<i>Hyptis suaveolens</i>	Krishnamurthy <i>et al.</i> (2006) - Índia	Folhas	Pó de folhas	Antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> com tratamento da semente de soja com diferentes produtos naturais e fungicida captan e foi inoculada com cepa toxigênica de <i>Aspergillus flavus</i> e incubada por diferentes períodos.	Pó de folhas de <i>H. suaveolens</i> controlaram a produção de aflatoxina B ₁ e foi significativamente eficaz na inibição da produção de aflatoxina B (1) em sementes de soja por <i>A. flavus</i> .
<i>Hyptis suaveolens</i>	Sharma e Tripathi. (2008) - Índia	Folhas	Óleo essencial	Antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> por tratamento com água quente, UV-C e óleo e ensaio <i>in vivo</i> em cordeiros de <i>Gladiolus</i> por tratamento com água quente, UV-C e óleo.	A eficácia fungitóxica <i>in vitro</i> do óleo essencial mostrou claramente que 0,6 µl.cm ⁻² de óleo foi suficiente para inibir completamente o crescimento de fungos e 0,4 µl.cm ⁻² de óleo inibia completamente germinação conidial. Um tratamento de óleo essencial de 0,8 µl.cm ⁻² durante 2 semanas foi significativamente eficaz na redução da população de patógenos durante o armazenamento. Os tratamentos integrados de água quente (55° C por 30 min), UV-C (dose 4,98 kJ.m ⁻²) e óleo essencial (0,8 µl.cm ⁻²) durante 2 semanas foram mais promissores do que os seus tratamentos sozinhos, após o armazenamento durante 4 e 12 semanas.
<i>Hyptis suaveolens</i> , <i>Hyptis rhomboidea</i> , e <i>Hyptis brevipes</i> .	Xu <i>et al.</i> (2013) - China	Partes aéreas	Óleo essencial	Antibacteriana e antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> usando a técnica de dupla diluição em tubo.	O óleo de <i>H. brevipes</i> exibiu a mais forte atividade antimicrobiana (3,125-6,25 µg ml ⁻¹) nos patógenos empregados no ensaio. Os três óleos da espécie <i>Hyptis</i> possuem fortes atividades antimicrobianas.
<i>Hyptis verticillata</i>	Kuhnt <i>et al.</i> (1995) - México	Partes aéreas	Óleo essencial	Antibacteriana	Ensaio <i>in vitro</i> com bactérias gram-positivas patogênicas <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus haemolyticus</i> e <i>Escherichia coli</i> gram-negativa usando um ensaio de difusão em ágar.	Embora o óleo não tenha mostrado atividade notável contra <i>E. coli</i> , foi significativamente ativo contra a Gram-positiva <i>S. aureus</i> . O óleo essencial contribuiu para os efeitos antibacterianos de <i>H. verticillata</i> . O óleo essencial inibiu o crescimento da bactéria gram-negativa <i>E. coli</i> em uma extensão notável.

Tabela 2.7 – Atividade antioxidante de fitoconstituintes de plantas do gênero *Hyptis*.

Espécie	Autor/ Ano/País	Parte da planta	Tipo de extrato	Atividade biológica	Modelo usado	Resultados
<i>Hyptis crenata</i>	Rebelo <i>et al.</i> (2009) - Brasil	Folhas e hastes	Óleo essencial e extrato metanólico	Antioxidante	Ensaio <i>in vitro</i> pelo teste de DPPH.	A percentagem de inibição de DPPH resultante variou de 42,6% a 79,9% no óleo fresco (HcOf) e de 24,5% a 71,4% no óleo seco (HcOd) mostrando poucas atividades antioxidantes. A percentagem de inibição de DPPH resultante variou de 14,2% a 94,0% no extrato de planta seca (HcEd) indicando uma propriedade antioxidante significativa.
<i>Hyptis fasciculata</i>	Silva <i>et al.</i> (2005) - Índia	Folhas	Extrato etanólico e butanólico	Antioxidante	Ensaio <i>in vitro</i> realizado por teste DPPH e ensaio de stress oxidativo para verificar a proteção de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> contra o stress oxidativo letal causado pelo TBH.	Os extratos etanólicos e butanólicos de <i>Hyptis fasciculata</i> foram capazes de aumentar a tolerância <i>S. cerevisiae</i> a TBH e mostraram-se ativos como sequestrantes de radicais DPPH, indicando que estes extratos vegetais poderiam ser considerados fontes potenciais de antioxidantes.
<i>Hyptis fasciculata</i>	Silva <i>et al.</i> (2009) - Brasil	Folhas	Extrato etanólico e composto isolado isoquercitrina	Antioxidante	Ensaio <i>in vitro</i> realizado pelo teste de DPPH e teste com células de levedura estressadas com peróxido de hidrogênio ou menadiona com verificação da oxidação intracelular.	O extrato alcoólico de <i>Hyptis fasciculata</i> e a isoquercitrina, um flavonóide identificado nesta espécie, mostrou-se ativo como eliminadores de radicais de 1,1-difenil-2-picridrazilo (DPPH) e foram capazes de aumentar a tolerância do microorganismo eucariótico <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tanto para o peróxido de hidrogênio como para a menadiona, uma fonte de superóxido.
<i>Hyptis fruticosa</i>	Andrade <i>et al.</i> (2010) - Brasil	Folhas	Extrato etanólico (EE) e partições de hexano, clorofórmio e acetato de etila	Antioxidante	Ensaio <i>in vitro</i> realizado pelo teste de DPPH.	O EE bruto e a partição acetato de etila apresentaram alto potencial antioxidante (IC ₅₀ - 35,00 ± 1,01 e 36,67 ± 2,65 µg/ml DPPH, respectivamente), semelhante ao referencial (IC ₅₀ - 16,67 ± 1,21 µg / ml).
<i>Hyptis martiusii</i>	Santos <i>et al.</i> (2010) - Brasil	Folhas	Extrato etanólico	Antioxidante	Ensaio <i>in vitro</i> realizado pelo teste de DPPH.	O extrato apresentou atividade antioxidante, mas a maior atividade foi observada com os extratos de <i>Momordica charantia</i> e <i>Eugenia jambolana</i> . <i>Hyptis martiusii</i> apresentou C ₅₀ = 134 µg/ml.
<i>Hyptis pectinata</i>	Serafini <i>et al.</i> (2017) - Brasil	Folhas	Óleo essencial e composto isolado (calamusenona)	Antioxidante	Ensaio <i>in vitro</i> realizado pelos testes de sequestro de Hidroxila Radical (OH), teste de sequestro de Óxido Nítrico (NO), Superóxido, Peróxido de Hidrogênio e Capacidade de absorção de radicais livres de oxigênio (ORAC).	O potencial da calamusenona para eliminar os radicais peroxila, extinguir radicais hidroxila e ânions superóxido e reduzir a formação de radiculas de óxido nítrico indica que este composto apresenta capacidade antioxidante de acordo com o ensaio e a concentração testada. A significativa atividade antioxidante apresentada pelo óleo essencial de <i>H. pectinata</i> pode ser atribuída à presença de calamusenona que está em alta concentração no óleo essencial (62,61%).
<i>H. radicans</i> , <i>H. campestris</i> , <i>H. meridionalis</i> , <i>H. comaroides</i> , <i>H. lacustris</i> , <i>H. lappulacea</i> e <i>H. multibracteata</i> .	Santos <i>et al.</i> (2018) - Brasil	Folhas, caules e flores	Extrato hidroetanólico	Antioxidante	Ensaio <i>in vitro</i> realizado por testes de DPPH e ABTS, redução de ferro (III) para ferro (II) e capacidade de absorção de radicais livres de oxigênio (ORAC).	Os extratos com maior atividade de extinção do DPPH foram de <i>H. lappulacea</i> (408,23 mg TE g ⁻¹) e <i>H. radicans</i> (350,14 mg TE g ⁻¹); <i>H. radicans</i> coletado durante a estação seca. <i>H. radicans</i> coletados na estação úmida (117,58 mg TE g ⁻¹) apresentaram os menores resultados. Para o ensaio ABTS, <i>H. comaroides</i> apresentaram a maior atividade antioxidante (581,46 mg TE g ⁻¹) seguida de <i>H. meridionalis</i> (572,32 mg TE g ⁻¹). <i>H. multibracteata</i> (247,51 mg TE g ⁻¹) apresentou os menores resultados.
<i>Hyptis rhomboidea</i>	Li <i>et al.</i> (2014) - China	Planta inteira	Extratos totais, éter de petróleo, acetato de etila e álcool n-butílico	Antioxidante	Ensaio <i>in vitro</i> realizado por testes de DPPH, ABTS e FRAP.	Os extratos totais e os extratos de acetato de etila apresentaram atividade antioxidante mais forte. No entanto, no ensaio ABTS, o extrato de petróleo e o extrato de álcool n-butílico não mostraram correlação linear significativa. Esses resultados sugerem que o <i>H. rhomboidea</i> mostra boa atividade antioxidante, especialmente no extrato de acetato de etila.

Tabela 2.7 – Atividade antioxidante de fitoconstituintes de plantas do gênero *Hyptis* (continuação)

<i>Hyptis spicigera</i>	Bayala <i>et al.</i> (2014) - Burkina Faso	Folhas	Óleo essencial	Antioxidante	Ensaio <i>in vitro</i> realizado pelo teste de DPPH e ABTS.	<i>H. spicigera</i> apresentou atividade antioxidante interessante.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Gavani <i>et al.</i> (2008) - Índia	Folhas	Extrato metanólico (extraído exaustivamente com éter de petróleo seguido de clorofórmio e metanol).	Antioxidante	Ensaio <i>in vitro</i> pelo teste DPPH usando ácido gálico e hidroxianisol butilado (BHA) como padrões de referência.	O ácido gálico, o BHA e o extrato metanólico de <i>Hyptis suaveolens</i> exibiram forte atividade de eliminação de radicais antioxidantes com IC ₅₀ valor de 0.4, 1.15 e 14.04 µg/ml.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Nanittanon <i>et al.</i> (2007) - Tailândia	Partes aéreas	Óleo essencial	Antioxidante	Ensaio <i>in vitro</i> pelo teste de eliminação de radicais DPPH e o ensaio de descoloração de radicais livres ABTS.	Os resultados de ambos os métodos indicam que a atividade antioxidante do óleo depende do tempo e da concentração. O potencial antioxidante do óleo determinado pelo método DPPH expresso como IC50 foi de 3,72 mg/ml enquanto que o valor TEAC (Capacidade Antioxidante Equivalente a Trolox) determinado pelo ensaio ABTS foi de 65,02 µM/mg.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Deepika <i>et al.</i> (2013) - Índia	Folhas	Extratos de n-hexano, acetato de etilo, acetona, metanol	Antioxidante	Ensaio <i>in vitro</i> pelos testes de DPPH, superóxido, radicais de peróxido de hidrogênio, atividade de energia redutora de ferro e inibição da peroxidação lipídica (TBARS)	Todos os ensaios <i>in vitro</i> realizados revelaram a excelência do extrato de acetato de etilo em contraste com outras frações. Os seus valores SC ₅₀ /IC ₅₀ /EC ₅₀ , calculados registraram impacto significativo com referência ao padrão.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Ghaffari H <i>et al.</i> (2014) - Índia	Partes aéreas	Extrato de metanol	Antioxidante	Ensaio <i>in vitro</i> pelos testes de DPPH, ABTS e FRAP.	O extrato apresentou uma potente atividade antioxidante conforme determinado por sal de diamônio de 2,20-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), 2,2-difenil-1-picrilidrazilo e ensaios de potência antioxidante redutora férrica. A actividade de eliminação de radicais mostrou claramente uma correlação positiva entre a actividade eliminadora de radical (diminuição da IC ₅₀ valor) e o aumento do teor total de fenol.

Tabela 2.8 – Atividade antinociceptiva, sedativa e anticonvulsivante de fitoconstituintes de plantas do gênero *Hyptis*.

Espécie	Autor/ Ano/País	Parte da planta	Composto	Atividade biológica	Modelo usado	Resultados
<i>Hyptis fruticosa</i>	Menezes <i>et al.</i> (2007) - Brasil	Folhas	Óleo essencial	Antinociceptiva	Ensaio <i>in vivo</i> em ratos Swiss com testes de contorções e de placa quente.	O óleo essencial, em doses de 100, 200 e 400 mg/kg (sc), produziu inibição significativa do retorcimento induzido pelo ácido acético, mas não manifestou efeito significativo no teste de placa quente. O óleo essencial tem atividade periférica antinociceptiva, com baixa toxicidade aguda.
<i>Hyptis fruticosa</i>	Silva <i>et al.</i> (2006) - Brasil	Folhas	Extrato aquoso	Antinociceptiva	Ensaio <i>in vivo</i> em camundongos Swiss com testes de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, teste de formalina e teste da placa quente	O extrato, administrado por via oral, reduziu as contorções abdominais induzidas por ácido acético (200, 400 e 500 mg/kg) e o tempo de reação dos animais na primeira fase do teste da formalina (100 mg/kg e 400 mg/kg). No teste da placa quente, o extrato aumentou o tempo de latência ao calor (100 e 200 mg/kg) tendo este efeito sido revertido pelo antagonista opióide naloxona (5 mg/kg, i.p.). No ensaio de toxicidade aguda, não foi detectada a morte de nenhum animal após tratamento com doses de até 5 g/kg (v.o.) do extrato. Os resultados obtidos indicam que o extrato apresenta efeito antinociceptivo em camundongos e não apresenta toxicidade aguda nas doses testadas.
<i>Hyptis fruticosa</i>	Franco <i>et al.</i> (2011) - Brasil	Folhas e flores	Óleo essencial	Antinociceptiva	Ensaio <i>in vivo</i> em ratos Swiss com contorções abdominais induzidas por ácido acético e testes de dor induzidos por formalina	O possível antagonismo dos efeitos antinociceptivos de óleos essenciais ou morfina (MOR) por pré-tratamento com naloxona não mostrou influência na ação antinociceptiva dos óleos no teste de contorção induzida pelo ácido acético. A amostra de óleo obtida das folhas coletadas durante o estágio de crescimento vegetativo, no Sítio Tujubeba, apresentou o maior efeito.
<i>Hyptis fruticosa</i>	Lima <i>et al.</i> (2013) - Brasil	Folhas	Extrato de hidroetanol	Antinociceptiva	Ensaio <i>in vivo</i> em ratos Swiss usando modelos de dor orofacial.	O extrato (200 mg/kg) reduziu significativamente ($p < 0,001$) a resposta da dor nas primeiras (69,6%) e segunda (81,8%) fases do teste de formalina, enquanto a nociceção causada pela capsaicina foi significativamente ($p < 0,001$) reduzida até 62% a 200 mg/kg de extrato. Quando se usou glutamato como alógeno, observou-se uma redução de nociceção significativa ($p < 0,001$) de até 85% a 200 mg/kg de extrato. O extrato mostrou uma maior proteção contra a lipoperoxidação causada pelo FeSO 4 (inibição de TBARS a 82,3%) do que a AAPH (35,7% de inibição de TBARS) a 150 µg/ml. O extrato hidroetanol da folha de <i>Hyptis fruticosa</i> é de interesse farmacológico porque foi capaz de inibir a transmissão periférica e central da dor orofacial, reduzindo a disseminação dos processos inflamatórios pela neutralização de espécies reativas de oxigênio, que são subprodutos na biossíntese de mediadores da dor.
<i>Hyptis pectinata</i>	Arrigoni-Blank <i>et al.</i> (2008) - Brasil	Partes aéreas	Óleo essencial	Antinociceptiva	Ensaio <i>in vivo</i> em ratos Swiss com testes de contorção abdominal e teste da placa quente	O óleo induz efeitos analgésicos variáveis, dependendo da origem dos genótipos. Os óleos dos seis genótipos de <i>H. pectinata</i> apresentaram efeitos antinociceptivos em ambos os modelos utilizados; o genótipo SAM002 mostrou o efeito inibitório principal na dose de 100 mg/kg de peso corporal. Estes resultados sugerem que o óleo volátil de <i>H. pectinata</i> tem efeitos periféricos (redução de sensação) e central (tempo de reação térmica).

Tabela 2.8 – Atividade antinociceptiva, sedativa e anticonvulsivante de fitoconstituintes de plantas do gênero *Hyptis* (continuação)

<i>Hyptis pectinata</i>	Lisboa <i>et al.</i> (2006) - Brasil	Folhas	Extratos de hexano, clorofórmio e acetato de etilo.	Antinociceptiva	Ensaio <i>in vivo</i> com testes de contorções e de placa quente.	Os extratos de hexano, clorofórmio e acetato de etilo (100, 200 e 400 mg/kg, po) de folhas de <i>H. pectinata</i> reduziram significativamente o número de contorções induzidas pelo ácido acético 0,6%. Além disso, todas as frações aumentaram significativamente a latência de lambar a pata traseira no teste da placa quente. Em conclusão, os extratos de <i>H. pectinata</i> possuem propriedades antinociceptivas significativas com efeito opióide e sítio de ação supraspinal.
<i>Hyptis pectinata</i>	Raymundo <i>et al.</i> (2011) - Brasil	Folhas	Óleo essencial (OE)	Antinociceptiva	Ensaio <i>in vivo</i> em ratos Balb/C com testes de contorções induzidas por ácido acético e placa quente ou resposta de lambida induzida por formalina e modelo subcutâneo de bolsa de ar.	O OE inibiu significativamente o número de contorções e o tempo que os animais passaram lambendo suas patas injetadas com formalina (segunda fase). O OE, em doses de 30 e 100 mg/kg, aumentou as medidas da linha de base e a área sob as medidas da curva no modelo de placa quente, respectivamente. A administração de naloxona inverteu o efeito antinociceptivo do OE no modelo de placa quente. I-NAME reverteu significativamente os efeitos do OE nas contorções e modelos de placas quentes. Atropina inverteu completamente a atividade antinociceptiva da OE em todos os modelos. Além disso, o OE inibiu o processo inflamatório induzido por injeção subcutânea de carragenina, reduzindo a migração celular, volume de exsudato, concentração de proteína e mediadores inflamatórios (óxido nítrico, prostaglandina E2, IL-6 e TNF- α) produzidos na bolsa. Nossos resultados indicam que o óleo essencial exibe efeitos antinociceptivos, provavelmente mediados por receptores opióides e colinérgicos e atividade antiinflamatória através da inibição da produção de óxido nítrico e PGE2.
<i>Hyptis pectinata</i>	Falcão <i>et al.</i> (2016) - Brasil	Folhas	Fração de acetato de etilo e ácido rosmarínico isolado	Antinociceptiva	Ensaio <i>in vivo</i> em ratos Swiss com testes em camundongos após a nociceção orofacial induzida por formalina, capsaicina e glutamato.	A administração oral de fração de acetato de etilo produziu efeitos antinociceptivos potentes em comparação com o tratamento com ácido rosmarínico.
<i>Hyptis pectinata</i>	Paixão <i>et al.</i> (2013) - Brasil	Folhas	Extrato aquoso	Antinociceptiva	Ensaio <i>in vivo</i> em ratos Swiss com a nociceção orofacial induzida por formalina, por glutamato e por capsaicina e o teste Rotarod.	O extrato aquoso em todas as doses reduziu ($p < 0,001$) a resposta nociceptiva na primeira (43-62%) e segunda (47-80%) fases do teste de formalina. O efeito do extrato (400 mg/kg) não foi alterado na presença de naloxona (1,5 mg/kg), um antagonista de opióides. O extrato inibiu significativamente o esfregaço facial de camundongos para capsaicina (23-69%, $p < 0,05$) e glutamato (48-77%, $p < 0,001$) em todas as doses. Os achados sugeriram que o extrato aquoso possui atividades antinociceptivas periféricas e centrais, que não estão relacionadas aos receptores opióides. O extrato aquoso inibiu significativamente o esfregaço facial de camundongos para capsaicina (23-69%, $p < 0,05$) e glutamato (48-77%, $p < 0,001$) em todas as doses.
<i>Hyptis spicigera</i>	Simões <i>et al.</i> (2017) - Brasil	Partes aéreas	Óleo essencial (OE)	Antinociceptiva	Ensaio <i>in vivo</i> em ratos Swiss com indução de estímulos químicos nocivos.	Verificamos o envolvimento dos canais TRP V1, A1 e M8 com a atividade do OE, que foi notavelmente potente e eficiente na inibição da dor evocada pelo mentol, um ativador do canal TRPM8. Os canais TRPM8 das fibras TRPV1 + C, mas não as fibras TRPM8 + C nem as fibras mecanossensoriais TRPM8 + A δ , medeiam os efeitos analgésicos dos OEs.
<i>H. suaveolens</i>	Santos <i>et al.</i> (2007a) - Brasil	Folhas	Extrato aquoso	Antinociceptiva	Ensaio <i>in vivo</i> em ratos Swiss com testes de contorções, de formalina e de placa quente.	A administração oral do extrato aquoso (100, 200 e 400 mg/kg) diminuiu de forma dependente da dose o número de contorções induzidas pelo ácido acético, diminuiu a atividade de lambedura da pata na fase inicial no teste de formalina e aumentou o tempo de reação na placa quente teste. O efeito antinociceptivo foi significativamente antagonizado pela naloxona (3 mg/kg, ip). O estudo preliminar de toxicidade aguda mostrou que nenhuma morte animal com doses de até 5 g/kg (po).

Tabela 2.8 – Atividade antinociceptiva, sedativa e anticonvulsivante de fitoconstituintes de plantas do gênero *Hyptis* (continuação)

<i>Hyptis suaveolens</i>	Begum <i>et al.</i> (2016) - Índia	Partes aéreas	Extrato etanólico aquoso concentrado (fracionado com água destilada, com éter de petróleo, clorofórmio, acetato de etilo e álcool n-butílico).	Antinociceptiva	Ensaio <i>in vivo</i> em ratos Swiss utilizando-se a contorção induzida pelo ácido acético e teste da placa quente e o teste da placa de orifício.	Os extratos de éter de petróleo e acetato de etilo produziram propriedades analgésicas significativas e foram máximas quando testados a 400 mg/kg. Ambos os extratos aumentaram significativamente o tempo de latência no teste de placa quente e a ação foi antagonizada pela naloxona. A naloxona não foi capaz de alterar o efeito de indução antinociceptiva de <i>H. suaveolens</i> no teste de contorção.
<i>Hyptis umbrosa</i>	Dos Anjos <i>et al.</i> (2017) - Brasil	Folhas	Extrato etanólico (EE)	Antinociceptiva	Ensaio <i>in vivo</i> em ratos Swiss utilizando contorção induzida por ácido acético, teste de formalina e hiperalgesia induzida por glutamato ou capsaicina. A peritonite foi induzida pela injeção intratorácica de carragenina para quantificar o número total de leucócitos.	O tratamento com EE, em todas as doses, produziu um efeito analgésico significativo contra a atividade antinociceptiva induzida pelo ácido acético. No teste da formalina, apenas a dose de 400 mg/kg de EE teve um efeito significativo na primeira fase. Contudo, todas as doses testadas foram capazes de reverter a nocicepção na segunda fase. O efeito de todas as doses de EE também mostrou um efeito antinociceptivo significativo nos testes de glutamato e capsaicina e inibiu a migração de leucócitos induzida por carragenina para a cavidade peritoneal.

Tabela 2.9 – Atividade citotóxica, genotóxica, antiproliferativa de fitoconstituintes de plantas do gênero *Hyptis*.

Espécie	Autor/ Ano/País	Parte da planta	Composto	Atividade biológica	Modelo usado	Resultados
<i>Hyptis crenata</i>	Rebello <i>et al.</i> (2009) - Brasil	Folhas e hastes finas	Óleo essencial e extrato metanólico	Citotoxicidade	Ensaio <i>in vivo</i> de letalidade de camarão de salmoura.	Para o bioensaio do camarão salmoura (<i>Artemia salina</i>) realizada com o óleo vegetal (HcOf) e extrato de metanol (HcEd) a concentração letal (CL 50) foi de 6,7 + 0,2 µg/ml e 13,0 + 3,7 µg/ml, respectivamente, mostrando uma citotoxicidade significativa onde o óleo foi duas vezes maior que o extrato de metanol. Óleos e extratos de plantas que apresentaram valores de concentração letais abaixo de 1000 µg/ml é considerado como bioativo
<i>Hyptis incana</i>	Tabata <i>et al.</i> (2012) - Brasil	Planta inteira	Compostos isolados (cinco diterpenos fenólicos: 7- etoxerosmanol, rosmanol, isorosmanol, epirosmanol e 7-metoxirosmanol)	Citotoxicidade (antitumoral)	Ensaio <i>in vitro</i> por MTT, citometria de fluxo e Western blotting.	Todos os compostos examinados exibiram citotoxicidade significativa em relação às células de neuroblastoma. Em particular, o 7-etoxirosmanol teve um alto grau de eficácia. A condensação nuclear e a degradação da procaspase-3 e -9 foram observadas após o tratamento das células com estes compostos. Além disso, diterpenos fenólicos induziram parada do ciclo celular na fase G(2)/M. Rosmanol e epirosmanol tenderam a induzir diferenciação. Diterpenos fenólicos isolados de <i>H. incana</i> possuem múltiplos efeitos antitumorais sobre as células do neuroblastoma.
<i>Hyptis martiusii</i>	De Figueirêdo <i>et al.</i> (2018) - Brasil	Folhas	Óleo essencial	Citotoxicidade (antitumoral)	Ensaio <i>in vitro</i> utilizando a cultura de linhagem de células do tecido conectivo de camundongo (broblastos de mamíferos).	A atividade citotóxica revelou a concentração letal média (LC ₅₀) de 263,12 µg/ml. Portanto, a <i>H. martiusii</i> apresenta atividade citotóxica.
<i>Hyptis martiusii</i>	Cruz <i>et al.</i> (2006) - Brasil	Raízes	Isolados dois diterpenos de tanshinona (7p-hidroxi- 11,14-dioxabieta-8,12- dieno e 7a-acetoxi-12- hidroxi-11,14-dioxabieta- 8,12-dieno)	Citotoxicidade (antitumoral)	Ensaio <i>in vitro</i> com cinco linhagens de células tumorais: B16 (pele murina), HCT-8 (cólon humano), MCF-7 (mama humana), e CEM e HL-60 (leucemias humanas), utilizando o método MTT.	Os compostos isolados apresentaram atividade citotóxica considerável contra várias linhas celulares de câncer com valores de IC50 na faixa de 3.1 a 11.5 µg/ml e 0.9 a 7.6 µg/ml, respectivamente.
<i>Hyptis martiusii</i>	Santos <i>et al.</i> (2013) - Brasil	Folhas	Extrato etanólico	Citotoxicidade	Ensaio <i>in vitro</i> com macrófagos J774 utilizando o método da resazurina.	<i>H. martiusii</i> demonstrou uma toxicidade moderada usando 100 e 10µg em macrófagos J774. O extrato etanólico de <i>H. martiusii</i> parece ser promissor no desenvolvimento de terapias mais efetivas, principalmente devido ao nível moderado de toxicidade <i>in vitro</i> , o que nos permite prosseguir com estudos <i>in vivo</i> para avaliação de medicamentos.
<i>Hyptis mutabilis</i>	Zapata <i>et al.</i> (2009) - Colômbia	Folhas	Óleo essencial	Citotoxicidade	Ensaio <i>in vitro</i> na linhagem celular Vero pela técnica colorimétrica de MTT.	O óleo não foi citotóxico nas células Vero.
<i>Hyptis pectinata</i>	Barbosa <i>et al.</i> (2012) - Brasil	Planta inteira	Extrato hidroetanólico	Citotoxicidade (antitumoral)	Ensaio <i>in vitro</i> contra linhagens tumorais humanas MDA-MB435 (câncer da mama humano), HCT-8 (câncer do cólon humano), SF-295 (glioblastoma humano) e HL-60 (leucemia) e ensaio <i>in vivo</i> utilizando sarcoma 180 em camundongos.	No ensaio preliminar <i>in vitro</i> , <i>Hyptis pectinata</i> apresentou citotoxicidade moderada: 62% de inibição contra células HCT-8line, não apresentou efeito hemolítico e na avaliação das atividades de citotoxicidade contra células mononucleares do sangue periférico, mostrou não-toxicidade. No <i>in vivo</i> , <i>Hyptis pectinata</i> inibiu o sarcoma 180 (70,5%). A análise histopatológica do fígado, rins e baço dos animais tratados mostrou ausência de lesões. Em conjunto, estes resultados sugerem que <i>Hyptis pectinata</i> apresentou potencial atividade antitumoral, pelo menos nos modelos farmacológicos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .

Tabela 2.9 – Atividade citotóxica, genotóxica, antiproliferativa de fitoconstituintes de plantas do gênero *Hyptis* (continuação)

<i>Hyptis suaveolens</i>	Deepika <i>et al.</i> (2013) - Índia	Folhas	Extratos de n-hexano, acetato de etilo, acetona, metanol e compostos isolados mentol e linalol	Citotoxicidade (antitumoral)	Ensaio <i>in vitro</i> realizados em linha celular de cancro da mama humano (MCF 7) por ensaio MTT	Estudos citotóxicos sobre os compostos isolados mentol e linalol produziram efeitos potentes sobre as células cancerígenas (MCF-7). O crescimento das linhas celulares foi inibido de um modo dependente da concentração durante 72 h de exposição às amostras de teste. Isto foi evidenciado pela diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração do composto, com a cisplatina como controle positivo.
<i>Hyptis verticillata</i>	Kuhnt <i>et al.</i> (1995) - México	Partes aéreas	Extrato bruto, resíduo aquoso, extrato etanólico e aquoso	Citotoxicidade (antitumoral)	Ensaio <i>in vitro</i> usando células HT 29 e células KB realizado pelo método colorimétrico usando sulforrodamina B como corante para proteína celular.	Com exceção da fração aquosa, todos os extratos e infusões apresentaram fortes efeitos citotóxicos. Embora as infusões aquosas e etanólicas contenham quantidades bastante diferentes de lignanas com atividade citotóxica conhecida, ambos os extratos têm uma citotoxicidade comparável.
<i>Hyptis verticillata</i>	White <i>et al.</i> (2011) - Jamaica	Partes aéreas	Composto isolado de extrato (4-metoxi-9-, 3, 4, 5-trimetoxifenil)-8-, 9 - didrofluro [3', 4': 6, 7] nafto [2, 3-d] [1, 3] dióxol-6 (5H) -ona (4-MTDND))	Citotoxicidade (antitumoral)	Ensaio <i>in vitro</i> em célula de leucemia pela técnica colorimétrica de MTT.	O novo agente, 4-MTDND, exibiu citotoxicidade contra uma miríade de tipos de câncer, com um amplo índice terapêutico de 30 a 40 vezes, promovido G 2/M e expressão regulada de proteínas pró-apoptóticas p53 e BAX, bem como ativação melhorada da caspase-3, caspase-9 e poli (ADP ribose) polimerase, consistente com a indução da apoptose. O novo agente citotóxico 4-MTDND induz a prisão de G 2/M e apoptose em células cancerígenas, possivelmente devido ao dano direto do DNA ou interferência
<i>Hyptis verticillata</i>	Hamada <i>et al.</i> (2012) - Jamaica	Partes aéreas	Extrato metanólico e compostos isolados (hipnose, hiptinina, β - peltatina, 4-demethyl-desoxypropodophyllo toxin, e deoxypropodophyllin)	Citotoxicidade (antitumoral)	Ensaio <i>in vitro</i> com a linha celular de leucemia de células T adulta SIT utilizando o método do sal de tetrazólio WST-8.	O extrato de metanol bruto mostrou efeitos citotóxicos significativos contra a linhagem celular SIT, leucemia de células T (ATL). Os cinco compostos isolados (hipnose, hiptinina, β - peltatina, 4-demethyl-desoxypropodophyllo toxin, e deoxypropodophyllin) apresentaram alta citotoxicidade contra SIT.
<i>Hyptis fasciculata</i>	Amado <i>et al.</i> (2009) - Brasil	Partes aéreas	Composto isolado (isoqueritrina)	Antiproliferativa	Ensaio <i>in vitro</i> com avaliação da capacidade do extrato de interferir no crescimento celular de glioblastoma (Gbm) e uso do método MTT.	Os dados mostram que a isoqueritrina reduz o crescimento de células Gbm sem induzir apoptose, possivelmente modulando o controle do ciclo celular. Os dados também sugerem que a sinalização mediada por beta-catenina pode estar envolvida na atividade antiproliferativa da isoqueritrina.
<i>Hyptis martiusii</i>	Cavalcanti <i>et al.</i> (2008) - Brasil	Razes	Compostos isolados (Tansinonas)	Genotoxicidade	Ensaio <i>in vitro</i> em células pulmonares de hamster chinês V79 utilizando o teste de eletroforese em gel alcalino unicelular (ensaio Cometa) e o teste do micronúcleo.	Os tansinonas de <i>H. martiusii</i> possuem efeitos genotóxicos e induzem mutações cromossômicas (MN) em células de fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V79) <i>in vitro</i> .
<i>Hyptis suaveolens</i>	Sumitha e Thoppil (2016) - Índia	Folhas	Extrato aquoso	Genotoxicidade (citotoxicidade)	Ensaio <i>in vitro</i> com uso de <i>Allium cepa</i> .	A citotoxicidade máxima foi observada no extrato contendo compostos polares e não polares. Ambas as plantas testadas foram consideradas citotóxicas. As anormalidades observadas foram de tipos clastogênicos (lesões nucleares, fragmentação nuclear, etc.) e não-clastogênicos (formação de parede celular aberrante em citocinese, metáfase de bola, etc.). O extrato de <i>Hyptis</i> inibiu significativamente (P < 0,05) o crescimento radicular de <i>Allium cepa</i> com um valor EC50 de 1,92% (R (2) = 0,594).

Tabela 2.10 – Atividade gastroprotetora, hepatoprotetora, citoprotetora, neuroprotetora, cicatrizante de fitoconstituintes de plantas do gênero *Hyptis*.

Espécie	Autor/ Ano/País	Parte da planta	Composto	Atividade biológica	Modelo usado	Resultados
<i>Hyptis crenata</i>	Diniz <i>et al.</i> (2013) - Brasil	Partes aéreas	Óleo essencial (OE)	Gastroproteção	Ensaio <i>in vivo</i> em ratos machos suíços com úlceras gástricas induzidas e etanol absoluto ou indometacina.	Uma inibição significativa de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto foi observada em camundongos pré-tratados com OE, nas doses de 30 e 100 e 300 mg/kg (5,56 ± 1,51; 2,88 ± 0,82 e 1,71 ± 0,54) mm(2), respectivamente) em relação ao grupo controle (118,03 ± 35,4mm(2)). Além disso, o OE (300 mg/kg) produziu um efeito gastroprotetor contra as lesões gástricas induzidas por indometacina (16,07 ± 4,68 mm(2)) em comparação ao grupo controle (38,64 ± 6,1mm(2)). O pré-tratamento com OE produziu uma redução na peroxidação lipídica induzida pelo etanol de 3,9 ± 0,22 para 2,4 ± 0,1 µmol/mg de tecido (OE:300 mg/kg e grupo controle, respectivamente). O OE normalizou os níveis séricos de ALP, ALT e bilirrubina e inibiu as alterações morfológicas. Além disso, o OE inibiu a elevação da peroxidação lipídica hepática e a redução da atividade da glutatona peroxidase induzida pela sepse. O OE desempenha um efeito protetor contra a lesão hepática induzida pela sepse.
<i>Hyptis crenata</i>	Lima <i>et al.</i> (2018)	Partes aéreas	Óleo essencial (OE)	Gastroproteção	Ensaio <i>in vivo</i> em camundongos onde a sepse foi induzida pelo modelo de ligadura e perfuração cecal (CLP) e a função hepática foi avaliada medindo os níveis séricos de bilirrubina, fosfatase alcalina (ALP), aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase (ALT).	O OE normalizou os níveis séricos de ALP, ALT e bilirrubina e inibiu as alterações morfológicas. Além disso, o OE inibiu a elevação da peroxidação lipídica hepática e a redução da atividade da glutatona peroxidase induzida pela sepse. O OE desempenha um efeito protetor contra a lesão hepática induzida pela sepse.
<i>Hyptis fruticosa</i>	Lima <i>et al.</i> (2012) - Brasil	Folhas	Extrato aquoso	Regeneração hepática	Ensaio <i>in vivo</i> em camundongos por coloração imuno-histoquímica para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) usando anticorpo monoclonal primário anti-PCNA em tecidos de fígado fixados em formol e embalados em parafina.	O índice de regeneração hepática do grupo HF foi 53,56 ± 18,91%, enquanto não grupo C foi de 21,12 ± 8,29% (p = 0,0003). Estes resultados mostram que a administração de extrato aquoso da <i>Hyptis fruticosa</i> na dose de 100mg/kg/dia aumentou a proliferação de hepatócitos no grupo HF e que, portanto, o extrato aquoso pode estimular a regeneração hepática em ratos.
<i>Hyptis martiusii</i>	Caldas <i>et al.</i> (2014) - Brasil	Folhas	Óleo essencial (OE)	Gastroproteção	Ensaio <i>in vivo</i> em ratos pelo modelo de úlcera gástrica induzida por etanol. A capacidade de cicatrização foi avaliada pelo modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético e análise histológica e imunistoquímica (HE, PAS e PCNA).	O OE (400 mg / kg) reduziu o volume e a acidez da secreção gástrica estimulada por histamina e pentagastrina. O efeito gastroprotetor do OE envolve a participação de grupos sulfidrilas endógenas. O OE aumentou a produção de muco (54,8%), reduziu os níveis de MDA (72,5%) e preveniu a depleção dos grupos-SH (73,8%) na mucosa gástrica. O tratamento com OE reduziu em 70,3% a área da lesão gástrica, promovendo significativa regeneração da mucosa gástrica, confirmada por análise histológica e análise do antígeno nuclear de proliferação celular. Os resultados mostram que o efeito gastroprotetor do OE é mediado por mecanismos citoprotetores e antioxidantes e por sua atividade antissecretor, e sugerem que o óleo essencial envolve a participação de grupos sulfidrilas endógenos.

Tabela 2.10 – Atividade gastroprotetora, hepatoprotetora, citoprotetora, neuroprotetora, cicatrizante de fitoconstituintes de plantas do gênero *Hyptis* (continuação)

<i>Hyptis maritima</i>	Rocha <i>et al.</i> (2015) - Brasil	Não diz	Composto isolado do óleo essencial (1,8-cineol) - CIN	Gastroproteção	Ensaio <i>in vivo</i> com ratos Wistar expostos a diferentes protocolos (ulceração aguda, motilidade gastrintestinal e atividade antissecretora). A capacidade de cicatrização foi avaliada por úlcera crônica induzida por ácido acético e análise histológica e imuno-histoquímica (PCNA, Ki-67 e BrdU).	O tratamento com CIN inibiu as lesões gástricas induzidas por etanol, etanol / HCl e indometacina. As doses mais altas de CIN inibiram o esvaziamento gástrico, mas não afetaram o trânsito intestinal. CIN (100 mg / kg) reduziu o volume de secreção ácida basal, mas não estimulada. A CIN aumentou os níveis de muco (89,3%), preveniu a depleção dos grupos -SH (62,6%) e reduziu o nível de peroxidação lipídica (55,3%) e a atividade da mieloperoxidase (59,4%) na mucosa gástrica. No modelo de úlcera crônica, a CIN reduziu em 43,1% a lesão da área gástrica, promoveu regeneração significativa e restauração dos níveis de muco nas células glandulares, como confirmado pela análise histológica; e promoveu aumento na proliferação celular como evidenciado pela reatividade para PCNA, Ki-67 e BrdU
<i>Hyptis maritima</i>	Caldas <i>et al.</i> (2011)	Folhas	Óleo essencial (OE)	Gastroproteção (antiulcerogênica)	Ensaio <i>in vivo</i> em ratos Wistar com úlcera gástrica aguda induzida com etanol absoluto, HCl / etanol e indometacina.	A administração oral de OE (100, 200 e 400 mg/kg) inibiu as úlceras induzidas por etanol, HCl/etanol e indometacina.
<i>Hyptis mutabilis</i>	Barbosa <i>et al.</i> (1992) - Brasil	Folhas	Óleo essencial	Gastroproteção (antiulcerogênica)	Ensaio <i>in vivo</i> com úlceras na mucosa gástrica de ratos machos induzidas por injeção subcutânea de indometacina.	Quando administrado previamente (po e ip), o óleo (F1473; 50-100 mg/kg) reduziu significativamente as alterações gástricas produzidas pela indometacina de forma dependente da dose.
<i>Hyptis pectinata</i>	Silva <i>et al.</i> (2002) - Brasil	Folhas	Extrato aquoso	Regeneração hepática	Ensaio <i>in vivo</i> em ratos por meio do método de imuno-histoquímica PCNA, usando o anticorpo monoclonal PC-10.	A administração durante 4 dias do extrato aquoso bruto liofilizado das folhas da <i>Hyptis pectinata</i> , na concentração de 100 mg/kg de animal, exerce significativo efeito estimulante sobre a regeneração do fígado após hepatectomia parcial de 67% em ratos.
<i>Hyptis pectinata</i>	Melo <i>et al.</i> (2001) - Brasil	Folhas	Extrato aquoso	Regeneração hepática	Ensaio <i>in vivo</i> com estudo da respiração mitocondrial pelo método polarográfico (oxígrafo de Gilson Méd. Electronics).	O grupo OSD200, quando comparado ao OS, apresentou redução significativa da fosfatase alcalina. O grupo HPD200, em comparação ao HP, teve redução estatisticamente significativa no nível da aspartato aminotransferase (AST) e do estado III da função mitocondrial. De alguma maneira, o extrato das folhas da planta reduziu a produção de energia mitocondrial, possivelmente sem lesão de membrana mitocondrial.
<i>Hyptis pectinata</i>	Melo <i>et al.</i> (2005) - Brasil	Folhas	Extrato aquoso	Regeneração hepática	Ensaio <i>in vivo</i> em ratos após hepatectomia parcial (HP) com extrato aquoso associado à terapia com laser.	A associação do extrato aquoso das folhas de <i>Hyptis pectinata</i> a 200 mg/kg com laserterapia intraoperatória podem estimular a regeneração hepática e causar uma redução na função respiratória mitocondrial do fígado sem alterar sua atividade fosforilativa.
<i>Hyptis spicigera</i>	Takayama <i>et al.</i> (2011) - Brasil	Inflorescências, folhas e haste	Óleo essencial (OE)	Gastroproteção	Ensaio <i>in vivo</i> em ratos WH foi avaliado em modelos experimentais de roedores (etanol e NSAID). Para elucidar os mecanismos de ação, foram avaliados a ação antissecretora e os acometimentos de NO, SH ₂ , muco e PGE2. O modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético e o ensaio Western Blot (COX-2 e EGF) também foram utilizados para avaliar a capacidade de cura do OE.	A ação gastroprotetora da OE ocorre devido ao aumento da produção de muco gástrico (28%) induzida pelos níveis de PGE2/prostaglandina). Além disso, a OE demonstrou uma grande capacidade de cura com 87% de redução na área de lesão ulcerativa. Acelerou a cicatrização de lesões gástricas induzidas pelo ácido acético devido ao aumento da expressão de COX-2 (75%) e EGF (115%) na mucosa gástrica. Nenhum sinal de toxicidade foi observado neste estudo,

Tabela 2.10 – Atividade gastroprotetora, hepatoprotetora, citoprotetora, neuroprotetora, cicatrizante de fitoconstituintes de plantas do gênero *Hyptis* (continuação)

<i>Hyptis suaveolens</i>	Ghaffari <i>et al.</i> (2014) - Índia	Partes aéreas	Extrato metanólico (EE)	Neuroprotetora	Ensaio <i>in vitro</i> com testes de citotoxicidade em células neuroblastoma. A indução de estresse oxidativo foi feita por H ₂ O ₂ e a viabilidade foi determinada por MTT.	A sobrevivência das células tratadas com diferentes concentrações de EE e H ₂ O ₂ aumentou em comparação com as células expostas apenas a H ₂ O ₂ (47,3%) (p <0,05). O EE mostrou diminuição da neurotoxicidade (atividade neuroprotetora).
<i>Hyptis suaveolens</i>	Vera-Arzave <i>et al.</i> (2012) - México	Folhas	Extrato de hexano e composto isolado suaveolol	Gastroproteção	Ensaio <i>in vivo</i> com um modelo experimental de úlcera gástrica induzida por etanol em ratos.	Os resultados mostram que o extrato de hexano tinha atividade protetora (parto de 70% ao usar doses entre 10 e 100 mg/kg) e que o composto suaveolol, isolado deste extrato, era um dos agentes gastroprotetores ativos. Os ratos tratados com este composto a 3, 10, 30 e 100 mg/kg apresentaram 12,6, 21,3, 39,6 e 70,2% de gastroproteção, respectivamente. O mecanismo de ação gastroprotetora deste composto envolve NO, prostaglandinas e grupos sulfidrilo.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Ghaffari <i>et al.</i> (2012) - Índia	Partes aéreas	Extrato metanólico	Hepatoprotetora (citoprotetora)	Ensaio <i>in vivo</i> com hepatotoxicidade induzida pelo tetracloreto de carbono (CCI 4) em ratos. A citotoxicidade foi também determinada por ensaio MTT.	O pré-tratamento com extrato metanólico de <i>H. suaveolens</i> foi eficaz na prevenção do dano hepático induzido por CCl ₄ em ratos. O peróxido de hidrogênio, um gerador de radicais livres, induz significativamente a morte celular em células cultivadas e o pré-tratamento das células com extrato vegetal inibe este processo de maneira dependente. Os efeitos inibitórios do extrato metanólico de <i>H. suaveolens</i> podem ser úteis como agentes hepatoprotetores e citoprotetores contra hepatotoxicidade e citotoxicidade induzidas quimicamente <i>in vivo</i> .
<i>Hyptis suaveolens</i>	Jesus <i>et al.</i> (2013)	Partes aéreas	Extrato etanólico (EtOHE) e frações de hexano (HexF), diclorometano (DCMF) e acetato de etilo (EEF).	Gastroproteção	Ensaio <i>in vivo</i> em vários modelos de úlceras gástricas agudas. A participação de NO foi avaliada por pré-tratamento com L-NAME e sulfidrídilos não proteicos por NEM no efeito gastroprotetor.	EtOHE e HexF reduziram marcadamente as lesões gástricas induzidas por todos os agentes ulcerogênicos (HCl/etanol, etanol, NSAIDs e tensão hipotérmica - estresse). As úlceras gástricas foram exacerbadas pela administração de NEM sugerindo que o mecanismo gastroprotetor de ação de EtOHE e HexF envolve grupos sulfidrilo. Nossos resultados mostram que um extrato de <i>Hyptis suaveolens</i> , administrado oralmente a roedores, apresenta atividade gastroprotetora em diferentes modelos de úlcera aguda da úlcera gástrica e fornece algum suporte para as reivindicações relatadas sobre o uso desta planta como agente gastroprotetor.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Shenoy <i>et al.</i> (2009) - Índia	Folhas	Extrato de éter de petróleo, éter de solvente, clorofórmio, álcool e água clorofórmica	Cicatrizante	Ensaio <i>in vivo</i> com modelos de excisão, incisão e cicatrização de espaço morto utilizando ratos Wistar albinos.	Entre os extratos, extratos de éter de petróleo apresentaram atividade cicatrizante significativa nos três modelos de ferida em comparação com outros extratos pelo cálculo dos parâmetros, porcentagem de fechamento da ferida de excisão, período de epitelização, resistência à tração, massa de granulação, força de quebra do tecido de granulação e teor de hidroxiprolina. O estudo histopatológico do tecido de granulação do grupo tratado com extrato de éter de petróleo evidenciou aumento da colagenação quando comparado ao grupo controle dos animais.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Shirwaikar <i>et al.</i> (2003) - Índia	Folhas	Extrato etanólico	Cicatrizante	Ensaio <i>in vivo</i> quanto à atividade de cicatrização de feridas em ratos Wistar anestesiados com éter, em duas doses diferentes (400 e 800mg/kg), utilizando incisão, excisão e modelo de ferida no espaço morto.	Observou-se aumento significativo da força de quebra da pele, da força de quebra do granuloma, da contração da ferida, do teor de hidroxiprolina e do peso do granuloma seco e diminuição do período de epitelização.
<i>Hyptis verticillata</i>	Kuhnt <i>et al.</i> (1995) - México	Partes aéreas	Extrato bruto e composto isolado siteritoflavona	Antisecretora	Ensaio <i>in vitro</i> utilizando o lado seroso ou mucoso do colon distal isolado de coelho, que é montado em uma câmara de Ussing modificada.	A siteritoflavona teve efeitos antisecretórios comparáveis aos da NPPB (5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)-benzoato) ao inibir a secreção de ácido clorídrico podendo ser usada no tratamento de dor estomacal.

Tabela 2.11 – Atividade inseticida, repelente e acaricida de fitoconstituintes de plantas do gênero *Hyptis*.

Espécie	Autor/Ano/País	Parte da planta	Composto	Atividade biológica	Modelo usado	Resultados
<i>Hyptis brevipes</i>	Sakr e Roshdy (2015) - Equador	Partes aéreas	Extrato metanólico	Inseticida	Ensaio <i>in vivo</i> com a técnica de mancha azul de bromofenol de mercúrio para determinar o efeito do extrato sobre o conteúdo total de proteínas nas células epiteliais do intestino médio.	O extrato metanólico causou efeitos dramáticos no desenvolvimento de larvas de <i>Spodoptera littoralis</i> e provocou alterações histológicas nos dois órgãos vitais (intestino médio e túbulos de Malpighi). A proteína total nas larvas tratadas também foi diminuída em comparação com o controle. A destruição da arquitetura nos órgãos testados e o baixo teor de proteínas nas células do intestino médio podem ser responsáveis pela privação de larvas de <i>S. littoralis</i> , que se seguiu por retardo no seu crescimento e finalmente na morte.
<i>Hyptis brevipes</i>	Sakr <i>et al.</i> (2013) - Equador	Partes aéreas	Extrato de diclorometano	Inseticida	Ensaio <i>in vivo</i> com folhas tratadas com extrato contra a larva do 3º estágio do verme da folha de algodão <i>Spodoptera littoralis</i> (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae)	Os extratos de <i>Hyptis brevipes</i> (Lamiaceae) demonstram uma forte atividade inseticida contra a larva do 3º estágio do verme da folha de algodão <i>Spodoptera littoralis</i> (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae), induzindo mortalidade larval completa devido à parada e/ou à interrupção da metamorfose. Essa interrupção induziu uma ampla gama de anormalidades. O valor CL ₅₀ (atividade larvicida) do extrato de diclorometano de <i>H. brevipes</i> foi de 3,0% (95% F.L. = 2,2% - 4,4%, declive = 3,1585 ± 0,952) após três dias de tratamento. Foram isolados dois compostos ativos a partir do extrato após o fracionamento guiado por bioensaio e foram identificados como 5-hidroxi-7,4-dimetoxi-flavon-3-ol e 5-hidroxi-7-metoxi-2-(4'-metoxi-fenil)-cromen-4-ona com base em dados espectroscópicos. Este é o primeiro relatório destes metabólitos secundários em <i>H. brevipes</i> .
<i>Hyptis maritima</i>	Araujo <i>et al.</i> (2003) - Brasil	Folhas e inflorescências	Óleo essencial e composto isolado 1,8-cineol	Inseticida	Ensaio <i>in vivo</i> contra <i>Bemisia argentifolii</i> (mosca branca) e larvas de <i>Aedes aegypti</i> .	O óleo essencial de folhas e 1,8-cineol mostrou efeito inseticida pronunciado contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Bemisia argentifolii</i> , vetores da dengue e praga da mosca-branca, respectivamente.
<i>Hyptis maritima</i> Benth.	Costa <i>et al.</i> (2005) - Brasil	Folhas	Óleo essencial	Inseticida	Ensaio <i>in vivo</i> utilizando larvas dos mosquitos <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> no terceiro estágio de vida.	As análises foram observadas após dez minutos do início do tratamento, e mostraram resultados bastante significativos, com potencialidade de mortalidade de até 100% das larvas testadas, indicando acentuados efeitos tóxicos de alguns constituintes voláteis presentes nos óleos. Para os óleos de <i>H. maritima</i> foram constatadas, frente à <i>Aedes aegypti</i> , valores respectivos de CL ₅₀ (atividade larvicida) de 18,5 ppm e frente ao <i>Culex quinquefasciatus</i> , 27,5 ppm, respectivamente.
<i>Hyptis pectinata</i>	Feitosa-Alcantara <i>et al.</i> (2017) - Brasil	Folhas	Óleo essencial	Inseticida	Ensaio <i>in vivo</i> das vias de exposição (contato e fumigação) e misturas binárias dos principais compostos do óleo contra as formigas cortadeiras <i>Acromyrmex balzani</i> Emery e <i>Atta sexdens rubropilosa</i> Forel.	Os óleos essenciais de <i>H. pectinata</i> foram tóxicos para as formigas em ambas as vias de exposição. Óleos essenciais eram mais tóxicos do que seus principais compostos sozinhos. O quimiotipo calamusenona foi mais tóxico para <i>A. balzani</i> em ambas as vias de exposição. <i>A. sexdens rubropilosa</i> foi mais suscetível ao óleo essencial do quimiotipo β-carotileno em ambas as vias de exposição. Em geral, as misturas binárias dos principais compostos resultaram em efeito aditivo de toxicidade. Os óleos essenciais de <i>H. pectinata</i> são uma matéria-prima de grande potencial para o desenvolvimento de novos inseticidas.

Tabela 2.11 – Atividade inseticida, repelente e acaricida de fitoconstituintes de plantas do gênero *Hyptis* (continuação)

<i>Hyptis pectinata</i> e <i>Hyptis fruticosa</i>	Silva <i>et al.</i> (2008) - Brasil	Folhas	Óleo essencial	Inseticida	Ensaio <i>in vivo</i> de contato com larvas de <i>Aedes aegypti</i> entre o terceiro e o quarto estágios adicionadas à solução de óleo essencial.	Com as maiores concentrações de óleo essencial, as larvas mostraram movimentos inquietos por algum tempo e depois se estabeleceram no fundo das taças com mago anormal e morreram lentamente. A taxa de mortalidade foi diretamente proporcional à concentração. Os constituintes voláteis das folhas induziram 100% de mortalidade de larvas de <i>A. aegypti</i> após 24 hs a 2000 mg/l (<i>H. fruticosa</i>) e 1000 mg/l (<i>H. pectinata</i>). Controle positivo <i>Tenebrio</i> exibiu 100% de mortalidade após 24 hs. Ambos, <i>H. fruticosa</i> e <i>H. pectinata</i> exibiram CL_{50} (atividade larvicida) de 502±2,70 ppm e 366±2,56 ppm, respectivamente. Embora o β -cariofileno (CL_{50} 1202±2,00 ppm) seja o principal composto no óleo essencial de <i>H. pectinata</i> , o óxido de cariofileno exibiu maior atividade larvicida (CL_{50} 125±2,05 ppm). O último é provavelmente o principal responsável pela atividade de óleo essencial de <i>H. pectinata</i> . Os bioensaios larvicidas mostraram que 1,8-cineol não é o princípio ativo do óleo essencial de <i>H. fruticosa</i> , uma vez que os resultados dos bioensaios com este componente revelaram CL_{50} de 1381± 2.10. No entanto, a ação sinérgica de outros constituintes menores, como o óxido de cariofileno, o R-limoneno (CL_{50} 37±2,08 ppm) e o γ -terpineno (CL_{50} 95±2.10 ppm) não podem ser desconsiderados. Portanto, óxido de cariofileno foi o principal responsável pela atividade de <i>H. pectinata</i> . Os compostos menores provavelmente estão atuando sinérgicamente para alcançar a atividade de <i>H. fruticosa</i> .
<i>Hyptis spicigera</i>	Sanon <i>et al.</i> (2006) - Burkina Faso	Folhas e caules	Pó e óleo essencial	Inseticida	Ensaio <i>in vivo</i> da toxicidade de pó e óleo de <i>H. spicigera</i> na frequência de postura de ovos e adultos e a toxicidade em ovos, larvas e pupas.	O óleo essencial teve um efeito inseticida dependente de dose, enquanto doses subletais repeliram os adultos. Ambos os produtos reduziram a oviposição em 15 - 19 e 7 - 78% de acordo com as doses de pó e óleo essencial, respectivamente, testados. Da mesma forma, a viabilidade dos ovos diminuiu com doses crescentes de pó e óleo essencial usados em uma faixa de 40 - 75 e 24 - 86%, respectivamente. Apenas o óleo essencial foi letal para as larvas de <i>C. maculatus</i> que se desenvolveram em sementes de feijão-caupi; no entanto, a atividade do óleo era dependente da idade, sendo os instares mais jovens mais suscetíveis.
<i>Hyptis spicigera</i>	Othira <i>et al.</i> (2009) - Quênia	Partes aéreas	Óleo essencial e pó	Inseticida e repelente	Ensaio <i>in vivo</i> contra besouros de milho (<i>Sitophilus zeamais</i> Motschulsky) e besouro de farinha vermelha (<i>Tribolium castaneum</i> Herbst) com testes de toxicidade por fumigação e toxicidade de contato com método de jarra perfurada.	Os resultados estabeleceram que ambas as partes da planta inteira e os extratos de óleo essencial destilados com vapor possuem forte atividade repelente de insetos a doses razoavelmente baixas. Após a exposição de insetos adultos recém-emergidos a 12 h de fumigação usando óleos essenciais em uma dose de 25 ml/vial, 70% de mortalidade foi registrada para <i>H. spicigera</i> e 0% no controle. O pó de plantas inteiras apresentou alta potência em comparação com extratos polares que não foram significativamente efetivos para os insetos. Extrato hexano mostrou a maior atividade de dissuasão alimentar em comparação com acetato de etilo ou extratos de água. O extrato de óleo de <i>Hyptis</i> no milho também foi o tratamento mais eficaz na redução da infestação de insetos e do dano de sementes em comparação com outros tratamentos no campo. Extratos de plantas inteiras e óleos essenciais descritos podem ser úteis para o manejo de populações de campo de <i>S. zeamais</i> e <i>T. castaneum</i> .
<i>Hyptis spicigera</i> e <i>Hyptis suaveolens</i>	Kouninki <i>et al.</i> (2005) - Camarões	Flores	Óleo essencial	Inseticida	Ensaio <i>in vivo</i> de contato e toxicidade por inalação contra diferentes estádios larvais e adultos de <i>Tribolium castaneum</i> em diferentes doses.	O óleo essencial de <i>Hyptis spicigera</i> foi o mais tóxico (fumigante) após 48 horas de fumigação. O óleo essencial é promissor para o controle de pragas em galinheiros de fazendeiros.

Tabela 2.11 – Atividade inseticida, repelente e acaricida de fitoconstituintes de plantas do gênero *Hyptis* (continuação)

<i>Hyptis suaveolens</i>	Aguirre <i>et al.</i> (2004) - México	Sementes	Inibidor de tripsina 8,7 kDa purificado de sementes de <i>H. suaveolens</i> (HST)	Inseticida	Ensaio <i>in vitro</i> com uso de enzimas proteolíticas extraídas de larvas de insetos <i>Prostephanus truncatus</i> em teste do zimograma e da determinação da atividade do inibidor da protease.	Sua atividade inibitória foi potente em relação a todas as proteases de tipo tripsina extraídas do intestino do inseto <i>Prostephanus truncatus</i> (Coleoptera: Bostrichidae), entre as pragas muito importante de milho. Esta atividade foi altamente específica, pois entre as proteases de sete insetos diferentes, apenas as de <i>P. truncatus</i> e <i>Manduca sexta</i> (Lepidoptera: Sphingidae) foram inibidos. Este inibidor tem potencial para melhorar o mecanismo de defesa do milho contra o ataque de <i>P. truncatus</i> .
<i>Hyptis suaveolens</i>	Iloba e Ekrakene (2006) - Nigéria	Folhas	Pó das folhas	Inseticida	Ensaio <i>in vivo</i> com testes de ingestão e comparação da taxa de mortalidade e emergência em adultos de <i>Callosobruchus maculatus</i> .	O resultado indicou que <i>Hyptis suaveolens</i> efetuou maior ação inseticida contra <i>Callosobruchus maculatus</i> nas concentrações de 1,5 a 3,5g de pó vegetais. A planta mostrou maior mortalidade em adultos e emergência em adultos de <i>C. maculatus</i> , onde porcentagem de mortalidade adulta variou de 93,4 a 96,6% para <i>H. suaveolens</i> , enquanto <i>Sitophilus zeamais</i> registrou 13,3 a 30% para <i>H. suaveolens</i> com os pós. O efeito de mortalidade de <i>H. suaveolens</i> contra <i>S. zeamais</i> diminuiu com a concentração. <i>H. suaveolens</i> tem atividades inseticidas moderada contra <i>S. zeamais</i> .
<i>Hyptis suaveolens</i>	Amusan <i>et al.</i> (2005) - Nigéria	Folhas	Extrato etanólico	Inseticida	Ensaio <i>in vivo</i> por meio do efeito tóxico contra as larvas de <i>Aedes aegypti</i> .	A dose letal média LD ₅₀ foi de 0,01 ppm para <i>H. suaveolens</i> , enquanto DL ₅₀ =0,60 ppm e DL ₉₀ foi de 1,45 ppm; DL ₉₅ para o controle 0,65 ppm, DL ₅₀ =0,9 ppm e DL ₉₀ =2,0 ppm. O extrato de <i>H. suaveolens</i> causou alta mortalidade nas larvas nas concentrações de 0,9 ppm (80%) e 0,3 ppm (80%). Diferenças significativas foram observadas entre as larvas não tratadas e tratadas (expostas a qualquer dos extratos) nas várias concentrações (P <0,05).
<i>Hyptis suaveolens</i>	Iloba e Ekrakene (2006) - Nigéria	Folhas	Pó	Inseticida	Ensaio <i>in vivo</i> contra <i>Sitophilus zeamais</i> e <i>Callosobruchus maculatus</i> pelo método de exame de materiais vegetais: mistura direta de materiais vegetais com grãos de milho desinfestados e sementes de feijão-caupi.	Os resultados revelaram que a mortalidade diária de <i>Sitophilus zeamais</i> foi dependente da concentração com o máximo de mortes ocorridas no terceiro dia da exposição. A mortalidade de <i>S. zeamais</i> foi ausente ou mínima nos dois primeiros dias de exposição. Isto, no entanto, contrastou o padrão de mortalidade exibido por <i>Callosobruchus maculatus</i> que apresentou mortalidade diária negativa com concentrações aumentadas, com alta mortalidade diária ocorrida nos dois primeiros dias de exposição.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Elumalai <i>et al.</i> (2017) - Índia	Folhas	Extrato aquoso	Inseticida	Ensaio <i>in vivo</i> com nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> , <i>Anopheles stephensi</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> .	O bioensaio larvicida com AgNPs, sintetizadas a partir do extrato de <i>H. suaveolens</i> , mostrou 100% de mortalidade a 10 mg/L contra <i>Aedes aegypti</i> , <i>Anopheles stephensi</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> com CL ₅₀ de 4,63, 4,04, 3,52 mg/l e CL ₉₀ de 12,07, 10,99, 09,61, respectivamente. Estes resultados sugerem que as AgNPs sintetizadas de <i>H. suaveolens</i> têm o potencial de ser utilizada como um agente ecologicamente correto ideal para o controle das larvas do mosquito.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Jaya <i>et al.</i> (2014) - Índia	Folhas	Óleo essencial (OE)	Inseticida	Ensaio <i>in vitro</i> contra <i>T. castaneum</i> , a praga de grãos armazenados, pelo método fumigante e ensaio <i>in vivo</i> pela fumigação de amostras de trigo armazenadas pelos óleos para manejo da deterioração causada por insetos	O OE foi considerado eficaz contra <i>Tribolium castaneum</i> durante testes de fumigação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . Os OEs de <i>H. suaveolens</i> mostrou 100% de mortalidade do inseto testado a 250 ppm. Durante o teste de fumigantes <i>in vivo</i> de amostras de trigo contra <i>Tribolium castaneum</i> , o óleo essencial de <i>H. suaveolens</i> reprimiu o dano completo do grão, mesmo com uma concentração de 500 ppm. Não houve efeito adverso na germinação das sementes, bem como no crescimento de plântulas de sementes tratadas com OE que mostram a natureza não fitotóxica do óleo. Por conseguinte, este OE podem ser recomendado como inseticida botânico contra a invasão de insetos de produtos alimentares armazenados, aumentando assim a sua vida útil.

Tabela 2.11 – Atividade inseticida, repelente e acaricida de fitoconstituintes de plantas do gênero *Hyptis* (continuação)

<i>Hyptis suaveolens</i>	Kovendan <i>et al.</i> (2012) - Índia	Planta inteira	Extrato de hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol.	Inseticida	Ensaio <i>in vivo</i> contra larvas de terceiro estágio de <i>Culex quinquefasciatus</i> com aplicações no campo com a ajuda de um pulverizador de dorso e uniformemente na superfície das massas de água de esgoto em cada habitat.	O extrato de hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol de <i>H. suaveolens</i> apresentaram valores CL_{50} de 213,09, 217,64, 167,59 e 86,93 ppm, contra larvas de terceiro estágio de <i>C. quinquefasciatus</i> . A mortalidade larval foi observada após 24 h de exposição. A atividade larvicida máxima foi observada no extrato metanólico seguido de acetato de etila, clorofórmio e extrato de hexano. Não houve mortalidade no controle. A mortalidade observada foi estatisticamente significativa ao nível de $P < 0,05$. A densidade das larvas diminuiu após o tratamento com extrato de planta nos locais de reprodução (água de esgoto) e, portanto, esse extrato pode ser uma alternativa adequada aos inseticidas sintéticos para o manejo do vetor do mosquito. O presente resultado sugere que o extrato de planta medicinal apresenta um excelente potencial para controlar o vetor filarial, <i>C. quinquefasciatus</i> .
<i>Hyptis suaveolens</i>	Olutuah (2013) - Nigéria	Folhas	Extrato de n-hexano, éter dietílico e metanol	Inseticida	Ensaio <i>in vivo</i> de fumigação direta contra adultos de <i>Stophilus oryzae</i> , <i>S. zeamais</i> e <i>Callosobruchus maculatus</i>	O experimento laboratorial revelou a alta capacidade inseticida de <i>H. suaveolens</i> no controle das pragas de insetos através do tratamento de contato e 100% de mortalidade de <i>Stophilus oryzae</i> , <i>Stophilus zeamais</i> e <i>Callosobruchus maculatus</i> em > 15 seg de aplicação de tratamento de extrato metanólico.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Hari e Mathew (2018) - Índia	Folhas	Extrato metanólico (EM), clorofórmio (EC) e éter de petróleo (EP)	Inseticida	Ensaio <i>in vivo</i> contra as larvas de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> conforme protocolo da OMS.	A atividade larvicida demonstrada pelo EP de <i>H. suaveolens</i> foi de CL_{50} 38,39 mg/L contra <i>Cx. quinquefasciatus</i> . No caso de <i>Aedes aegypti</i> , o EP de <i>H. suaveolens</i> apresentou LC 50 64,49 mg/L.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Conti <i>et al.</i> (2012) - Nepal	Folhas	Óleo essencial (OE)	Inseticida e repelente	Ensaio <i>in vivo</i> contra larvas de <i>Aedes Albopictus</i> quarto estágio e da isca humana.	O OE de <i>H. suaveolens</i> teve atividade inseticida contra larvas de <i>Aedes Albopictus</i> e a mortalidade que dependeram da dosagem. Nas doses mais altas de 450 e 400 ppm, não houve diferenças significativas na mortalidade larval, pois a mortalidade variou entre 98,33% e 93,33%, respectivamente. Em doses variando de 250 a 350 ppm, as taxas de mortalidade foram menores e não significativamente diferentes entre si. Os resultados indicaram que este OE tinha uma atividade repelente significativa (RD = 0,00035 μ g cm ⁻²); RD = 0,00048 μ g cm ⁻²), com diferenças nas taxas de repelência, em função da concentração e do tempo de observação. O tempo de proteção variou de 16 a 135 min. Estes resultados evidenciaram claramente que a atividade larvicida e repelente do OE de <i>H. suaveolens</i> poderia ser usada para o desenvolvimento de produtos novos e mais seguros contra <i>A. albopictus</i> .
<i>Hyptis suaveolens</i>	Acida <i>et al.</i> (2011) - Benin	Folhas e caules	Extrato aquoso	Inseticida	Ensaio <i>in vivo</i> contra <i>Sesamia calamistis</i> no milho <i>Zea mays</i> L. (Poales: Poaceae). As variáveis medidas incluíram o número de massas de ovos por planta, ovos por massa de ovos (no estudo screenhouse), densidade populacional de <i>S. calamistis</i> , porcentagem de plantas infestadas e/ou espigas, e "deadhearts" no campo.	Independentemente da variável considerada, o extrato aquoso de <i>H. suaveolens</i> foi favoravelmente comparado ao Furadan, enquanto o milho rodeado por plantas vivas de <i>H. suaveolens</i> apresentou menor densidade de <i>S. calamistis</i> e "deadhearts" no campo.

Tabela 2.11 – Atividade inseticida, repelente e acaricida de fitoconstituintes de plantas do gênero *Hyptis* (continuação)

<i>Hyptis suaveolens</i>	Tripathi e Upadhyay (2009) - Índia	Folhas	Óleo essencial	Inseticida e repelente	Ensaio <i>in vivo</i> contra <i>Callosobruchus maculatus</i> (Bruchidae), <i>Rhizopertha dominica</i> (Bostrychidae), <i>Staphylinus ozyzae</i> (Curculionidae) e <i>Tribolium castaneum</i> (Tenebrionidae) com teste de preferência de área para repelência, ensaio da toxicidade de fumigação, ensaio da toxicidade de contato pela aplicação tópica, ensaio de persistência.	O óleo essencial extraído das folhas de <i>H. suaveolens</i> , cujos constituintes principais são sabino, terpinen-4-ol, limoneno e β -pineno, mostrou atividades repelentes e inseticidas contra quatro besouros armazenados. O óleo essencial da folha de <i>H. suaveolens</i> pode ter potencial como alternativa aos pesticidas sintéticos utilizados no tratamento do grão no armazenamento.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Benelli <i>et al.</i> (2012) - Itália	Folhas	Óleo essencial (OE)	Inseticida	Ensaio <i>in vivo</i> com testes de ingestão, contato e fumigação contra <i>Ceratitis capitata</i> .	O OE de <i>Hyptis suaveolens</i> mostrou efeito tóxico notável contra adultos do mosquito, independentemente do bioensaio utilizado. O desenvolvimento de uma tecnologia que permita a incorporação do OE em uma isca alimentar poderia fornecer um método alternativo de aplicações em campo para atrair e matar <i>C. capitata</i> .
<i>Hyptis suaveolens</i> , <i>Hyptis spicigera</i>	Ilboudo <i>et al.</i> (2010) - Burkina Faso	Partes aéreas	Óleo essencial (OE)	Inseticida	Ensaio <i>in vivo</i> com testes de suscetibilidade de adultos de <i>Callosobruchus maculatus</i> ao OE, persistência da atividade biológica do OE e o impacto da temperatura na atividade biológica do OE.	Óleo essencial extraído de <i>H. suaveolens</i> exibiu forte atividade inseticida com um CL_{50} valor de 1,30 μ l/l. O óleo essencial extraído de <i>H. spicigera</i> possuiam uma atividade inseticida menos forte com valores de CL_{50} > 5 μ l/l.
<i>Hyptis suaveolens</i> e <i>Hyptis spicigera</i>	Sanon <i>et al.</i> (2011) - Burkina Faso	Partes aéreas	Pó seco e óleo essencial	Inseticida	Ensaio <i>in vivo</i> com pré-tratamento de hospedeiros com folhas de pó seco e óleos essenciais e verificação da capacidade parasitária de fêmeas de <i>Dinarmus basalis</i> e produção de filhotes	Ambas as espécies de plantas exercem toxicidade aguda nas larvas de <i>D. basalis</i> e também atuam como inibidores de crescimento. Esses resultados fornecem informações adicionais que nos permitem avançar para o uso harmonioso de compostos aleloquímicos de plantas, enquanto protegem os agentes de controle biológico de seus efeitos adversos.
<i>Hyptis suaveolens</i> <i>Poit.</i>	Pavunraj <i>et al.</i> (2014) - Índia	Folhas	Extratos brutos de hexano, cloroformo e acetato de etila	Inseticida	Ensaio <i>in vivo</i> por meio de disco de folha e métodos disco de frutas sem chance de escolha contra <i>Helicoverpa armigera</i> , <i>Spodoptera litura</i> , <i>Earias vittella</i> e <i>Leucinodes orbonalis</i> .	Extrato de acetato de etila de <i>H. suaveolens</i> exibiu a atividade antifeedante e inseticida máxima a uma concentração de 1% em relação a todos os insetos testados. Foi submetido a fracionamento utilizando cromatografia em coluna de sílica com diferentes combinações de hexano e acetato de etila utilizados como fase móvel. Entre as 15 frações obtidas, a fração 2 mostrou a atividade antifeedante e inseticida máxima contra todos os insetos testados a 1000 ppm de concentração. A análise fitoquímica preliminar da fração 2 mostrou a presença de terpenoides e alcalóides. <i>H. suaveolens</i> pode ser considerado um inseticida seguro e ecológico para o manejo de pragas de lepidópteros.
<i>Hyptis verticillata</i> <i>Jacq.</i>	Porter <i>et al.</i> (1995) - Jamaica	Folhas e hastes	Composto isolado de extrato (cadina-4,10(15)-dien-3-one)	Inseticida e acaricida	Ensaio <i>in vivo</i> com aplicação tópica contra adultos de <i>Cylas formicarius</i> (ação inseticida) e fêmeas adultas <i>Boophilus microplus</i> (ação acaricida).	O estudo revelou que a cadina-4,10(15)-dien-3-one possui atividades de quimioesterilização contra o carrapato bovino economicamente importante, <i>Boophilus microplus</i> e ação tóxica contra <i>Cylas formicarius</i> adulto, a praga mais destrutiva de batata-doce (<i>Ipomoea sp.</i>).
<i>Hyptis verticillata</i> <i>Jacq.</i>	Facey <i>et al.</i> (2005) - Jamaica	Partes aéreas	Óleo essencial	Inseticida e acaricida	Ensaio <i>in vivo</i> com aplicação tópica contra adultos de <i>Cylas formicarius</i> (ação inseticida) e fêmeas adultas <i>Boophilus microplus</i> (ação acaricida).	O óleo exibiu atividade quimioesterilizante contra o carrapato de gado, <i>Boophilus microplus</i> Canest., e ação tóxica contra adultos <i>Cylas formicarius</i> e <i>Boophilus microplus</i> (espécies de <i>Ipomoea</i>) praga mais destrutiva da batata-doce.
<i>Hyptis mutabilis</i>	Gillji <i>et al.</i> (2008) - Argentina	Não diz	Óleo essencial (OE)	Repelência	Ensaio <i>in vivo</i> contra <i>Aedes aegypti</i> por meio de um ensaio em gaiola, em que os indivíduos inseriram o braço tratado com o produto em uma gaiola com um número fixo de mosquitos não alimentados com sangue e registrou-se o tempo decorrido até a primeira mordida.	A maioria dos OEs foram eficazes. Variações dependendo da origem geográfica da planta foram detectadas.

Tabela 2.11 – Atividade inseticida, repelente e acaricida de fitoconstituintes de plantas do gênero *Hyptis* (continuação)

<i>Hyptis suaveolens</i>	Vongsombath <i>et al.</i> (2012) - Laos	Partes aéreas	Óleo essencial	Repelência	Ensaio <i>in vivo</i> com teste de repelência com isca humana em Reserva Florestal contra insetos dos gêneros <i>Armigeres</i> , <i>Culex</i> e <i>Aedes</i> .	O óleo de <i>Hyptis suaveolens</i> testado em concentrações de 1.7 µg/cm ² , 3.3µg/cm ² , e 6.3µg/cm ² foram significativamente mais repelente de mosquitos do que o controle negativo. O óleo de <i>Hyptis</i> foi significativamente repelente contra <i>Armigeres</i> a 3.3µg/cm ² e 6.3µg/cm ² e contra <i>Culex</i> em 1.7µg/cm ² e 6.3µg/cm ² .
<i>Hyptis suaveolens</i>	Conti <i>et al.</i> (2011) - Itália	Folhas	Óleo essencial	Repelência	Ensaio <i>in vivo</i> contra o gorgojo do celeiro <i>Sitophilus granarius</i> (L.) (<i>Coleoptera: Dryophthorididae</i>), uma das maiores pragas de cereais armazenadas no mundo.	Os resultados de aplicações tóxicas em insetos mostraram que ambos os óleos essenciais tinham uma atividade inseticida efetiva. A morte completa de <i>S. granarius</i> foi observada 24 h após o tratamento com uma dose mínima efetiva de 0,4 e 0,6 µl por inseto com óleo de <i>H. suaveolens</i> e <i>H. spicigera</i> , respectivamente. Os resultados dos testes de repelência mostraram que os dois óleos essenciais tinham atividade repelente em adultos de <i>S. granarius</i> : na dose mais baixa (2 x 10 ⁻⁴ µl de óleo por cm ²), o óleo essencial de <i>H. spicigera</i> exibiu um efeito repelente mais alto em comparação com <i>H. suaveolens</i> . Não foram observadas diferenças significativas quanto ao efeito repelente entre os dois óleos essenciais com a dose mais elevada (2 x 10 ⁻² µl de óleo por cm ²).
<i>Hyptis suaveolens</i>	Conti <i>et al.</i> (2012) - Nepal	Folhas	Óleo essencial (OE)	Repelência	Ensaio <i>in vivo</i> com larvas de quarto estágio com determinação da taxa de mortalidade e uso da técnica de isca humana contra o mosquito tigre asiático, <i>Aedes albopictus</i> Skuse (<i>Diptera: Culicidae</i>)	O OE de <i>H. suaveolens</i> teve atividade inseticida contra larvas de <i>A. albopictus</i> e a mortalidade que dependeram da dosagem. Nas doses mais altas de 450 e 400 ppm, não houve diferenças significativas na mortalidade larval, pois a mortalidade variou entre 98,33% e 93,33%, respectivamente. Em doses variando de 250 a 350 ppm, as taxas de mortalidade foram menores e não significativamente diferentes entre si. Os resultados indicaram que este OE tinha uma atividade repelente significativa (RD = 0,00035 µg cm ⁻²); RD = 0,00048 µg cm ⁻²), com diferenças nas taxas de repelência, em função da concentração e do tempo de observação. O tempo de proteção variou de 16 a 135 min. Estes resultados evidenciaram claramente que a atividade larvicida e repelente do OE de <i>H. suaveolens</i> poderia ser usada para o desenvolvimento de produtos novos e mais seguros contra <i>A. albopictus</i> .
<i>Hyptis suaveolens</i>	Pälsson e Jaenson (1999) - Guiné Bissau	Planta inteira	Planta queimada com carvão vegetal e planta fresca	Repelência	Ensaio <i>in vivo</i> com teste de repelência com isca humana na região de Óio.	No primeiro experimento verificamos a repelência de 73,2% de <i>H. suaveolens</i> fresco e 85,4% de <i>H. suaveolens</i> ardido. No segundo experimento verificamos a repelência de 66,5% de <i>H. suaveolens</i> fresco e 83,6% de <i>H. suaveolens</i> ardido.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Abagli <i>et al.</i> (2012) - Benim	Folhas	Óleo essencial (OE)	Repelência	Ensaio <i>in vivo</i> por meio da mordedura de mosquito <i>Anopheles gambiae</i> em condições laboratoriais e de campo.	No laboratório, a porcentagem de mosquitos que pousaram no antebraço foi de 42, 33, 23, 23, 9 e 2 para 1%, 2%, 3%, 4%, 5% e 6% de concentração de óleo essencial, respectivamente; e 92 e 91 para o solvente (isopropanol) e controle não tratado, respectivamente. A porcentagem de mosquitos que se alimentaram de uma farinha de sangue foi de 22, 12, 13, 12, 5 e 3 para 1%, 2%, 3%, 4%, 5% e 6% de óleo essencial, respectivamente; e 52 e 51 para o solvente e controle, respectivamente. No campo, o óleo essencial de 6% repeliu todos os mosquitos imediatamente após a aplicação; esta atividade diminuiu para 75% após 5 h. A ação repelente da concentração de OE de 8% foi maior, 97% após 5 h. Com base nesses dados, o óleo essencial de <i>H. suaveolens</i> parece ser um bom candidato para uso na gestão integrada de mosquitos da doença.
<i>Hyptis suaveolens</i> 6	Benelli <i>et al.</i> (2012) - Burkina Faso	Folhas	Óleo essencial	Repelência	Ensaio <i>in vivo</i> com adultos do gorgulho-espinho <i>Sitophilus granarius</i> (L.) (<i>Coleoptera Dryophthoridae</i>) em testes de placa de Petri e de queda.	Os dados mostraram que o OE <i>H. suaveolens</i> possui uma atividade repelente visível contra <i>S. granarius</i> em ambos os métodos de teste. Além disso, em todos os ensaios, foram encontradas boas taxas de repelência de terpinoleno, β-pineno e sabineno, em particular em doses mais baixas.

Tabela 2.12 – Atividade anti-inflamatória, antiedematogênica e vasorelaxante de fitoconstituintes de plantas do gênero *Hyptis*.

Espécie	Autor/Ano/País	Parte da planta	Composto	Atividade biológica	Modelo usado	Resultados
<i>Hyptis albidá</i>	Miranda <i>et al.</i> (2013) - México	Partes aéreas	Extrato de clorofórmio	Anti-inflamatória	Ensaio <i>in vitro</i> usando macrófagos peritoneais induzidos por lipopolissacarídeos de camundongos (LPS).	O extrato de clorofórmio de <i>Hyptis albidá</i> (CHA) inibe a produção induzida por LPS (lipopolissacarídeos de ratos) do fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6). O CHA é um potente inibidor da inflamação. Inibiu a liberação de mediadores inflamatórios de macrófagos e suprimiu a sobre-expressão de genes relevantes.
<i>Hyptis fruticosa</i>	Andrade <i>et al.</i> (2010) - Brasil	Folhas	Extrato etanólico (EE) e partições de hexano (n-C6H14), clorofórmio (CHCl3), acetado de etila (AcOEt) e hidrometanol (MeOH/H2O)	Anti-inflamatória	Ensaio <i>in vivo</i> em ratos Wistar avaliada utilizando o modelo de edema de pata induzido por 1% de carragenina, administrado no volume de 0,1 ml /animal na região subplantar da pata traseira direita do rato	O tratamento oral com o EE das folhas da <i>H. fruticosa</i> (100, 200 e 400 mg/kg) ou suas partições n-C6H14, AcOEt e MeOH/H2O (50, 100 e 200 mg/kg) apresentou atividade inibitória sobre a formação de edema e migração leucocitária para a cavidade peritoneal induzidas pela carragenina em ratos (p<0,05). Entretanto, a partição CHCl3 não causou nenhum efeito sobre a formação de edema e migração de células peritoneais.
<i>Hyptis pectinata</i>	Raymundo <i>et al.</i> (2011) - Brasil	Folhas	Óleo essencial	Anti-inflamatória	Ensaio <i>in vivo</i> em ratos BAL/C utilizando modelos para analgesia (contorções induzidas por ácido acético e placa quente) ou inflamação (resposta de lambida induzida por formalina e modelo subcutâneo de bolsa de ar).	O OE inibiu o processo inflamatório induzido pela injeção subcutânea de carragenina, reduzindo a migração celular, o volume de exsudato, a concentração de proteínas e os mediadores inflamatórios (óxido nítrico, prostaglandina E2, IL-6 e TNF- α) produzidos na bolsa.
<i>Hyptis spicigera</i>	Bayala <i>et al.</i> (2014) - Burkina Faso	Folhas	Óleo essencial	Anti-inflamatória	Ensaio <i>in vitro</i> medindo-se a inibição da atividade da lipoxigenase	<i>H. spicigera</i> apresentou inibição de 75,1% a 8 mg/ml e não foi observado efeito significativo a 0,4 mg/l.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Grassi <i>et al.</i> (2006) - Áustria	Folhas	Composto isodoad e (suaveolol e o suaveolato de metilol)	Anti-inflamatória	Ensaio <i>in vivo</i> por meio da inibição da dermatite de contato induzida por óleo de cróton da orelha do rato.	O suaveolol e o suaveolato de metilol mostraram quase a mesma atividade anti-inflamatória tópica dependente da dose, apenas duas a três vezes inferior à do fármaco de referência indometacina.
<i>Hyptis umbrosa</i>	Dos Anjos <i>et al.</i> (2017) - Brasil	Folhas	Extrato etanólico (EE)	Anti-inflamatória	Ensaio <i>in vivo</i> em ratos Swiss com peritonite induzida pela injeção intratorácica de carragenina.	O efeito de todas as doses de EE inibiu a migração de leucócitos induzida por carragenina para a cavidade peritoneal. O EE mostrou potencial na redução da disseminação dos processos inflamatórios.
<i>Hyptis verticillata</i>	Kuhnt <i>et al.</i> (1995) - México	Partes aéreas	Composto isolado de extrato (ácido rosmarinico, sideritoflavona)	Anti-inflamatória	Ensaio <i>in vitro</i> por meio do teste HET-CAM com ovos de galinha após 10 dias de incubação.	O ácido rosmarinico apresentou efeitos estabilizadores significativos nos capilares. A sideritoflavona inibiu a prostaglandina sintase em uma extensão significativa e teve efeitos antissecretórios comparáveis aos da NPPB (5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) – benzoato).

Tabela 2.12 – Atividade anti-inflamatória, antiedematogênica e vasorelaxante de fitoconstituintes de plantas do gênero *Hyptis* (continuação)

<i>Hyptis martiusii</i>	Barbosa <i>et al.</i> (2017) - Brasil	Folhas	Óleo essencial (OE)	Antiedematogênica	Ensaio <i>in vivo</i> em ratos pelos modelos de edema de orelha induzido por aplicações simples (edema agudo) e múltiplas (edema crônico) de óleo de crôton topicamente, e verificados sistemicamente através do modelo de edema de pata induzido por carragenina a 1%.	No modelo do edema da orelha, o OE agudo e crônico em todas as doses testadas não apresentou atividade antiedematogênica significativa ($p < 0,05$). O modelo sistêmico de edema da pata induzido pela carragenina mostrou que uma dose de 100 mg/kg efetivamente reduziu o inchaço em 55,37% na avaliação da segunda hora quando comparado ao grupo salino. Conclui-se, portanto, que o OE apresenta atividade antiedematogênica sistêmica, mas não a atividade tópica nessas doses.
<i>H. pectinata</i>	Arrigoni-Blank <i>et al.</i> (2005) - Brasil	Folhas	Extrato aquoso	Antiedematogênico	Ensaio <i>in vivo</i> em rato usando o edema induzido por carragenina nas doses de 200, 400 e 600 mg/kg.	Os extratos administrados oralmente tiveram um efeito anti-edematogênico significativo. A dose de 200 mg/kg de acessos SAM004 e SAM005 teve um efeito mais forte, reduzindo o edema em 19,6% e 15,4%, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos utilizando doses mais elevadas do extrato aquoso de acessos SAM002, SAM003 e SAM006. P
<i>Hyptis fruticosa</i>	Moreira <i>et al.</i> (2010) - Brasil	Partes aéreas	Extrato diclorometano	Vasorelaxante	Ensaio <i>in vitro</i> em anéis isolados de artéria mesentérica de ratos.	O extrato de diclorometano de <i>Hyptis fruticosa</i> Salzm. ex Benth., Lamiaceae, (HFDE) produz efeito vasorelaxante na artéria mesentérica superior de rato através de uma via independente do endotélio, possivelmente devido à inibição do influxo de Ca ²⁺ através de canais de Ca ²⁺ operados por voltagem.

Tabela 2.13 – Atividade anti-diabética, antidepressiva, moluscicida, espasmolítica e hipotensão associada à taquicardia de fitoconstituintes de plantas do gênero *Hyptis*.

Espécie	Autor/ Ano/País	Parte da planta	Composto	Atividade biológica	Modelo usado	Resultados
<i>Hyptis suaveolens</i>	Mishra <i>et al.</i> (2011) - Índia	Folhas	Extrato etanólico aquoso	Antidiabética	Ensaio <i>in vivo</i> em ratos Sprague-dawley e ratos Swiss com diabetes induzido por estreptozotocina	Uma redução significativa na glicose no sangue foi observada em animais diabéticos tratados com HSE em diferentes doses quando comparados com ratos diabéticos. Os resultados mostram que o HSE possui atividade anti-hiperglicêmica significativa, que pode ser atribuída a efeitos estimulantes na utilização de glicose e enzimas antioxidantes.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Begum <i>et al.</i> (2016) - Índia	Partes aéreas	Extrato etanólico aquoso e frações éter de petróleo, clorofórmio, acetato de etilo, n-butanol	Antidiabética	Ensaio <i>in vivo</i> por meio de hemidifração isolado de ratos.	As frações testadas de <i>Hyptis suaveolens</i> apresentaram capacidade de captação de glicose significativa e dependente da dose, sendo máxima com éter de petróleo e extratos etanólicos aquosos. A atividade de <i>H. suaveolens</i> é comparável à insulina padrão (P <0,01).
<i>Hyptis pectinata</i>	Bueno <i>et al.</i> (2006) - Brasil	Folhas	Extrato aquoso (EA)	Antidepressivo	Ensaio <i>in vivo</i> utilizando hipotermia induzida por apomorfina, labirinto em cruz elevado e testes de sono induzidos por tiopental em camundongos.	No modelo de hipotermia induzida pela apomorfina onde o EA (200 mg/kg) antagonizou o efeito da apomorfina (AE200: -0,27 °C, q = 5,588; P <0,001, n = 10) de maneira semelhante à imipramina (5 mg/kg) (controle: -1,08 °C; imipramina: 0,02 °C, q = 7,589, P <0,001, n = 10). O efeito do EA foi observado nos testes de labirinto em cruz e no tempo do sono induzido por tiopental. Os resultados sugerem um possível efeito antidepressivo do extrato aquoso.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Salawu <i>et al.</i> (2011) - Nigéria	Folhas	Extrato aquoso	Moluscicida	Ensaio <i>in vivo</i> com determinação da taxa de mortalidade dos diferentes estágios do caracol expostos ao extrato.	As taxas de mortalidade variaram com as concentrações e o tempo de exposição. Os resultados mostraram que o estágio dos ovos de <i>Bulinus globosus</i> foi o mais resistente ao extrato etanólico de <i>H. suaveolens</i> .
<i>Hyptis macrostachys</i>	Costa <i>et al.</i> (2014) - Brasil	Partes aéreas	Composto isolado de extrato (hyptenolide)	Espasmolítica	Ensaio <i>in vitro</i> por meio de contrações tônicas induzidas por carbacol em traquéia isolada de cobaia e sobre o caracol e as contrações fásicas induzidas pela histamina em íleo de cobaia isolado.	O hyptenolide inibiu as contrações induzidas por CCh (IC 50 = 1,7 ± 0,3 x 10 ⁻⁴ M) ou de histamina (IC 50 = 0,9 ± 0,05 x 10 ⁻⁴ M) em íleo de cobaia, demonstrando pela primeira vez uma atividade farmacológica para a pirona.
<i>Hyptis fruticosa</i>	Santos <i>et al.</i> (2007b) - Brasil	Folhas	Óleo essencial (OE)	Hipotensão associada à taquicardia	Ensaio <i>in vivo</i> com avaliação da pressão arterial (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos não anestesiados e ensaio <i>in vitro</i> utilizando anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato.	O OE induz efeito hipotensor com aumento contemporâneo da frequência cardíaca, provavelmente de origem reflexa. Esse efeito hipotensor provavelmente pode ser devido a uma vasodilatação direta e consequente diminuição da resistência vascular periférica. Esta vasodilatação parece ser devida a uma inibição do influxo de Ca ²⁺ através dos canais de Ca ²⁺ operados por voltagem.

Tabela 2.14 – Testes toxicológicos realizados em plantas do gênero *Hyptis*.

Espécie	Autor/ Ano/País	Parte da planta	Composto	Modelo usado	Resultados
<i>Hyptis fruticosa</i>	Menezes <i>et al.</i> (2007) – Brasil	Folhas	Óleo essencial	Ensaio <i>in vivo</i> com camundongos recebendo subcutaneamente 1, 3 e 5 g/kg de óleo.	Não houve toxicidade aguda em doses até 5g/kg.
<i>Hyptis fruticosa</i>	Silva <i>et al.</i> (2006) – Brasil	Folhas	Extrato aquoso	Ensaio <i>in vivo</i> em camundongos avaliada através da administração oral de doses crescentes do extrato aquoso (1, 3 e 5 g/kg).	Os resultados obtidos indicam que o extrato aquoso da <i>Hyptis fruticosa</i> não apresenta toxicidade aguda nas doses testadas.
<i>Hyptis pectinata</i>	Suzery <i>et al.</i> (2017) – Indonésia	Folhas	Extrato espesso após a evaporação	Ensaio <i>in vivo</i> por via oral com sonda gástrica. Aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis e o teste de Mann-Whitney.	O extrato é seguro de usar, que não causou nenhuma complicação com o fígado de camundongos.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Bezerra <i>et al.</i> (2017) – Brasil	Folhas	Óleo essencial e infusão de folhas	Ensaio <i>in vivo</i> em organismos modelo (<i>Artemia salina</i> e <i>Drosophila melanogaster</i>)	A infusão de folhas de <i>H. suaveolens</i> não foi tóxica para os organismos em todas as concentrações testadas ($p > 0,05$). Entretanto, o OE comportou-se como bastante tóxico com CL_{50} de 15,5 e 49,72 $\mu\text{g/ml}$ em <i>D. melanogaster</i> e <i>A. salina</i> , respectivamente. Além disso, o OE causou comprometimento do comportamento locomotor das moscas.
<i>Hyptis suaveolens</i> , <i>Hyptis rhomboides</i> , e <i>Hyptis brevipes</i> .	Xu <i>et al.</i> (2013) – China	Partes aéreas	Óleo essencial	Ensaio <i>in vivo</i> pelo uso do camarão de salmoura.	Todos mostraram toxicidades significativas com valores de concentração letal mediana (CL_{50}) de $62,2 \pm 3,07 \mu\text{g ml}^{-1}$, $65,9 \pm 6,55 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $60,8 \pm 9,04 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente.

2.4 CONCLUSÃO

Esta revisão sistemática reuniu uma série de estudos que versam sobre a composição química e as atividades biológicas de compostos bioativos extraídos de plantas do gênero *Hyptis*, todos oriundos de bases de dados mundialmente reconhecidas (Scopus, Pubmed, Science direct e Scielo). Uma vez que representantes deste gênero são intensamente usados na medicina popular para tratamento de enfermidades, vários investigadores se viram envolvidos pela oportunidade de encontrar nestas plantas novos constituintes com propriedades biológicas farmacologicamente importantes.

Desta forma, há de se ressaltar algumas publicações para espécies *Hyptis*. Todavia, é preciso considerar que ainda há espaço para o desenvolvimento de novas pesquisas. Só para se ter uma ideia, há relatos da existência de 400 espécies de plantas do gênero *Hyptis*, e conforme, esta revisão apenas 40 espécies foram avaliadas, 25 quanto a composição química, 30 quanto a atividades biológica, 05 quanto a toxicologia, 01 quanto a alimentação.

Se considerarmos, por exemplo, a atividade biológica mais investigada (atividade antimicrobiana), verificamos que foram estudadas 18 espécies de *Hyptis* e ainda falta 382 espécies a serem pesquisadas. Destas espécies algumas foram avaliadas quanto ao efeito do óleo essencial ou do extrato ou da biomassa. Até mesmo para testes envolvendo a espécie *Hyptis suaveolens* (a mais estudada), há uma infinidade de microorganismos, como bactérias, fungos, leveduras, protozoários e vírus ainda não relatados na literatura. Sem falar de fatores como genética, clima, solo, fotoperíodo, fase de desenvolvimento da planta, latitude e altitude e parte da planta que interferem no teor e composição química dos fitoconstituintes ativos e que podem configurar casos de polimorfismo químico nas espécies *Hyptis*.

Desta forma, novos estudos devem ser desenvolvidos variando testes de bioatividade, espécies, parte da planta, tipo de composto, época e local de coleta. Diante dos resultados significativos para diversas atividades biológicas, recomenda-se o prosseguimento de estudos envolvendo as espécies do gênero *Hyptis*.

Capítulo 3

AVALIAÇÃO DO CULTIVO *IN VITRO* DE *Hyptis* spp. NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

3. AVALIAÇÃO DO CULTIVO *IN VITRO* DE *Hyptis* spp. NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

3.1 INTRODUÇÃO

A forte demanda comercial pela produção de medicamentos naturais para tratamento de enfermidades tem crescido bastante nos últimos anos sendo necessário a busca de alternativas que supram essa necessária produção. As plantas têm contribuído de forma significativa para o fornecimento de produtos naturais, ou metabólitos secundários, muitos destes com grande valor agregado devido à imensa atividade farmacológica que possuem. Para se ter uma ideia, 80% das substâncias medicamentosas, como drogas antimicrobianas, cardiovasculares, imunossupressoras e anticâncer, são diretamente derivadas de produtos naturais ou desenvolvidas a partir de um composto natural de plantas (Maridass e Britto, 2008; Gordaliza, 2009; Pan *et al.*, 2013).

Entretanto, deve-se pontuar que apesar da produção considerável de compostos naturais pelas plantas, o isolamento dos mesmos na quantidade necessária para os usos citados acima é difícil e limitado. Em parte, pela produção que é restrita a algumas espécies ou mesmo por serem utilizados pelas próprias plantas (Bhojwani e Razdan, 1996). Além disso, grande parte das espécies de importância na produção de metabólitos ainda é selvagem ou está passando por processo de domesticação, sendo assim, pouco cultivadas (Bhojwani e Razdan, 1996). Diante destes impasses, o cultivo *in vitro* de plantas surge como uma maneira alternativa e bastante promissora para produzir os correspondentes metabólitos secundários.

Os avanços do cultivo *in vitro* de plantas como ferramenta para diversas áreas de investigação, incluindo a biotecnologia, refletem positivamente na pesquisa básica, na indústria e na agricultura. Entre as várias possibilidades de aplicação desta técnica existe um amplo interesse em culturas de células e tecidos vegetais com abordagens biotecnológicas voltadas à produção de plantas medicinais e isolamento de produtos secundários com potencial bioativo (Briskin, 2007).

Desde o início da utilização da técnica de cultura de tecidos, constatou-se que espécies vegetais cultivadas *in vitro* são dotadas da capacidade inerente de sintetizar compostos químicos valiosos semelhantes aqueles produzidos por suas espécies *in natura* (Siddiqui *et al.*, 2013) e que esse potencial deve ser melhor elucidado. Além do mais, esta técnica possibilitará o fornecimento de compostos químicos de forma contínua ao longo do ano, o controle das condições ambientais de crescimento, o cultivo em curto espaço de tempo e em áreas pequenas quando comparados com as áreas agrícolas (Sidhu, 2010).

Diferentes estratégias, usando sistemas de cultura de células e tecidos, vêm sendo aplicados com o objetivo de aumentar a produção de metabólitos secundários. Dentre as quais, as aplicadas à cultura de calos e suspensão celular tem apresentado resultado significativo na biossíntese destes metabólitos (Tripathi *et al.*, 2013).

Calos e células em suspensão podem ter o rendimento alavancado com o desencadeamento da resposta ao estresse provocado por uso de elicitores e/ou mudanças nas condições do ambiente e/ou mudanças nos constituintes do meio e/ou uso de reguladores de crescimento e biotransformação (Patel e Krishnamurthy, 2013). Contudo, é de se considerar que mesmo diante da diversidade de técnicas desenvolvidas ligadas a biotecnologia de plantas, há muitas barreiras a serem superadas para uma produção eficiente de metabólitos de interesse comercial e que somente o investimento em mais pesquisas poderá proporcionar o sucesso.

O gênero *Hyptis*, pertencente à família Lamiaceae, apresenta uma variedade de espécies de plantas medicinais com potencial farmacológico e cuja atividade biológica necessita de estudos biotecnológicos. Existem relatos na literatura científica sobre a propagação *in vitro* de *H. leucocephata*, *H. platanifolia* (Nepomuceno *et al.*, 2014), *H. marrubioides* (Pedroso *et al.*, 2017 e 2019b) e *H. suaveolens* (Velóz *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2019) e sobre a indução de calos e cultura de raízes de *H. suaveolens* (Velóz *et al.*, 2013). Alguns estudos avaliaram a interferência de eliciadores químicos e físicos sobre o crescimento de plântulas e produção de compostos fenólicos ou voláteis (Pedroso *et al.*, 2017 e 2019b; Andrade *et al.*, 2017a; Rodrigues *et al.*, 2019) e obtiveram resultados bem promissores. Diante do potencial de plantas *Hyptis* para síntese de compostos bioativos de interesse econômico, o objetivo deste estudo foi a avaliação dos metabólitos secundários produzidos por culturas de calos e células em suspensão (antes e após eliciação) de *H. marrubioides*, *H. pectinata* e *H. suaveolens*.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Obtenção do material vegetal

Sementes de *Hyptis marrubioides* (Hm), *H. pectinata* (Hp) e *H. suaveolens* (Hs) foram coletadas no campo experimental do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano (IFGoiano), Campus Rio Verde, nas coordenadas aproximadas de 17°48'3,81''S e 50°54'0,07''W; 17°48'3,94''S e 50°53'9,99''W e 17°48'3,81''S e 50°54'0,01''W, respectivamente, altitude de 727m, no período da manhã do dia 02 de agosto de 2014. Exsicatas das três espécies coletadas foram depositadas no Herbário do IFGoiano sob os códigos, respectivamente, 476, 477 e 492 (Figura 3.1).



Figura 3.1 – Exsicatas de *Hyptis marrubioides*, *H. pectinata* e *H. suaveolens*, respectivamente.

3.2.2 Estabelecimento e multiplicação *in vitro*

Para obtenção de plântulas anéxicas, as sementes de Hm, Hp e Hs passaram por tratamento de desinfecção onde foram embebidas em álcool 70% por 5 minutos, transferidas para solução aquosa de

hipoclorito de sódio comercial (2,5% de cloro ativo) durante 30 minutos e, na câmara de fluxo laminar, foram realizadas três lavagens consecutivas com água destilada estéril. Posteriormente, as sementes foram semeadas em placas de petri (90 x 15 mm) contendo 20 ml de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ sacarose e 3,5 g L⁻¹ de ágar e vedados com parafilme. O pH do meio foi então ajustado para 5,7 ± 0,03 antes da adição do ágar e, a seguir, já com o ágar, foi autoclavado a 120°C sob 1,2 atm, durante 20 minutos.

Após germinação das sementes, esperou-se três meses para que as plântulas produzidas fossem transplantadas para frascos de vidro (108 x 74 mm) com 40 ml de meio MS, preparado nas mesmas condições descritas para germinação da semente, e vedados com tampas plásticas de polipropileno. A indução de brotos foi realizada a partir de explantes de segmentos caulinares com aproximadamente 1cm de comprimento e contendo 1-2 nós. Os subcultivos foram realizados a cada 30 dias. As culturas foram mantidas a 25 ± 3°C, umidade relativa de 45%, fotoperíodo de 16 horas e sob radiação fotossintética ativa de 45-55 μmol m⁻² s⁻¹, fornecido por lâmpadas fluorescentes. Algumas plântulas foram congeladas e liofilizadas para constituir a biomassa vegetal *in vitro*, que foi identificada e armazenada em câmara fria a -20°C, até a preparação dos extratos.

3.2.3 Indução de Calos

Folhas e segmentos caulinares de plântulas germinadas *in vitro* foram utilizados como explantes e inoculados em frascos contendo 40 ml de meio MS, 30 g L⁻¹ de sacarose, 3,5 g L⁻¹ de ágar e fitorreguladores. Diferentes combinações hormonais de auxina 2,4-D/ANA (ácido 2,4-diclorofenoxiacético/ácido naftalenacético) e citocinina BA/Cin (6-benzilaminopurina/cinetina) foram utilizadas: 2,4-D (4,5 μM) + Cin (0,9 μM); ANA (5,3 μM) + BA (0,8 μM) e ANA (13,4 μM) + BA (4,4 μM). As amostras inoculadas foram mantidas em sala de crescimento com as mesmas condições descritas no estabelecimento de plântulas *in vitro* por 60 dias. O tratamento que apresentou maior número de explantes convertido em calos foi utilizado como meio base para o cultivo nos demais experimentos. Os calos foram repicados a cada 30 dias sendo que em cada frasco, foram inoculados 5 fragmentos de calos com cerca de 5mm de diâmetro (25mg). Alguns calos foram congelados e liofilizados para constituir a biomassa seca que foi macerada em metanol 80% na proporção 1:2 (g/ml), homogeneizada no

ultrasonicador por 15 minutos e estocada no escuro à temperatura ambiente. Esta solução foi filtrada e utilizada para análise em HPLC/Ms.

3.2.4 Cultura de suspensão celular

Após seis meses de subcultivos mensais, os calos apresentaram um crescimento uniforme e passaram a possuir agregados de células homogêneos. Estes calos friáveis foram excisados e usados na obtenção de suspensões celulares, cultivadas sob agitação em balões erlenmeyer 250 ml contendo meio MS sem ágar, suplementado com BAP/ANA (4,4 μ M e 13,4 μ M). Os subcultivos aconteceram a cada 15 dias. Destaca-se, que não houve formação de calos friáveis de *Hyptis pectinata* a tempo para o desenvolvimento do teste de eliciação em culturas de suspensão celular. Os calos eram grandes, verdes e duros. Calos friáveis para esta espécie só foram possíveis após dois anos do início dos trabalhos.

3.2.5 Determinação da curva de crescimento da suspensão celular

Para cada espécie, um total de 200 ml de suspensões celulares estáveis e com 15 dias de cultivo em 4 frascos de vidro (108x74 mm) foram homogenizadas em um único Erlenmeyer de 500 ml. A seguir, distribuíram-se alíquotas de 5 ml do inóculo para frascos com 30 ml de meio MS sem ágar e suplementado com BA/ANA (4,4 μ M e 13,4 μ M) perfazendo um total de 28 frascos. Foram realizadas determinações da massa celular, pH e da viabilidade celular do inoculado a partir do dia da inoculação (tempo 0) e com 2, 5, 10, 13, 15, 17 e 22 dias de inoculação. A cada intervalo, eram retirados 4 frascos ao acaso para análise. Uma alíquota de 0,1ml de cada frasco foi utilizada para o teste de viabilidade celular por azul de tripan. O conteúdo por frasco foi transferido para um tubo falcon de 50ml que foi centrifugado por 10 min a 4500rpm. O sobrenadante foi separado das células, teve o pH medido, foi congelado e mantido a -80°C até a hora da análise do açúcar residual. As células foram congeladas, liofilizadas, pesadas em balança analítica (precisão 0,1 mg) e utilizadas posteriormente, conforme o item 3.2.7, para determinação de compostos fenólicos. A partir do peso seco foram determinadas as fases lag, exponencial, linear, de desaceleração, estacionária e de declínio do crescimento das culturas em suspensão.

3.2.5.1 Quantificação de açúcares do meio de cultura das suspensões celulares

A quantificação de açúcares (sacarose, glucose e frutose) presentes no meio de cultura das suspensões celulares de *Hyptis* spp. foi realizada pelo método do padrão externo. Os padrões utilizados foram sacarose, glucose e frutose da marca Sigma-Aldrich. Num eppendorf, contendo 1,45 ml de amostra (meio de cultura) adicionou-se 0,05ml de solução de ácido perclórico 60% e homogenizou-se em agitador vortex. A seguir, colocou-se o eppendorf em gelo por 30 minutos e centrifugou-se por 10 min a 5000 rpm e temperatura de 4°C. O sobrenadante foi separado e filtrado com um filtro de nylon de 0,2µm (PALL-Acrodisc) e colocado em *vial* para análise em aparelho cromatográfico HPLC (Sistema LaChrom Elite® da VWR-Hitachi), equipado com detetor de índice de refração, um forno de colunas modelo L-2300, um injetor de loop 20µl, uma coluna Hyper EZ XP Carbohydrate H+ (Thermo, USA), tamanho de partícula de 8 µm, a uma temperatura de 40°C. Os resultados obtidos foram analisados usando o software EZChrom Elite. Para separação dos açúcares adotou-se o sistema isocrático de 0,5 ml.min⁻¹, tendo como fase móvel solução de ácido sulfúrico 2,5mM, preparada em água ultra-pura Milli-Q, filtrada por um filtro de nylon de 0,2µm (Lida, USA) e desgaseificada por vácuo.

3.2.5.2 Determinação dos compostos fenólicos da biomassa celular

Adicionou-se num tubo falcon (50ml) o total de 100mg de biomassa celular seca (Hm, Hp e Hs) e 2ml de solução metanol-água (80:20). Essa mistura foi sonicada em ultrasonicator (Brandson 2510) por 15 min e estocada por 7 dias no escuro e à temperatura ambiente. Logo a seguir, filtrou-se 1 ml de cada solução usando um filtro de membrana de 0,45µm (Milipore) acoplado a uma seringa. Esta solução metanólica foi colocada em *vials* e armazenado no escuro a 4°C até o momento da análise HPLC/Ms.

3.2.5.3 Teste de viabilidade celular

A viabilidade celular das culturas em suspensão foi determinada pelo método de exclusão por azul de tripan. Em uma lâmina colocou-se 0,1ml de suspensão celular com 0,1 ml de solução de azul tripan (0,4%, Sigma-Aldrich). Após 10 minutos, em microscópio de luz, verificou-se a percentagem de

viabilidade, para cada amostra, contando as células viáveis (incolores) e as células mortas (coradas). A seguir, aplicou-se a equação matemática $(V/NT) \times 100$, onde, V=células viáveis e NT=número total de células viáveis e não viáveis.

3.2.6 Eliciação das culturas

Visando aumentar a produção de metabólitos secundários, de interesse econômico ou medicinal, como o ácido rosmarínico (AR), utilizamos estratégias de eliciação nas culturas de células em suspensão de *H. marruboides* e *H. suaveolens*. Entre estes, procedeu-se a eliciação das culturas com eliciadores abióticos, ácido salicílico (AS) e metil jasmonato (MeJ) e com um eliciador biótico, extrato de levedura (EL).

Observando a cinética de crescimento celular das culturas em suspensão, optou-se por realizar as eliciações na fase linear. Com a estabilização das culturas celulares após 8 repicagens quinzenais e consecutivas, numa câmara de fluxo laminar, juntou-se em um Erlenmeyer estéril (500 ml), o conteúdo de suspensão celular de 05 frascos (cada um com 50ml de suspensão). Para homogeneização da cultura agitou-se o Erlenmeyer. A seguir, dispensou-se alíquotas de 10 ml de cultura celular homogeneizada em frascos contendo 50 ml de meio MS sem ágar, suplementado com BAP/ANA (4,4 μ M e 13,4 μ M). Estes foram mantidos sob agitação em sala de crescimento.

Após 8^a dia da repicagem, iniciou-se o procedimento de eliciação com uso de AS, MeJ e EL. Os tratamentos consistiram em adição de diferentes volumes destes eliciadores, cada um deles em 10 frascos contendo 50 ml de cultura de células em suspensão. Destes, cinco frascos foram identificados para avaliação com 24h e os outros cinco para 48h. O controle foi constituído de cinco frascos independentes com água destilada estéril no lugar do eliciador.

Para o tratamento com ácido salicílico (C₇H₆O₃, Aldrich, Espanha) adicionou-se 25 μ l da solução de ácido salicílico a 50mM em cada frasco de cultura de células. Já para o tratamento com metil jasmonato (C₁₃H₂₀O₃, Merck, Alemanha), utilizou-se 25 μ l e 100 μ l da solução de metil jasmonato a 300mM enquanto que para o extrato de levedura (Cultimed, Uk) trabalhou-se com 100 μ l, 250 μ l e 500 μ l da solução de extrato de levedura a 1g /10ml. Para realização de todos os tratamentos foram utilizados 120 frascos com 50 ml de cultura de células em suspensão para cada espécie.

Respeitou-se o prazo de 24hs e 48hs de cada tratamento para coleta de amostra a ser usada no teste de viabilidade celular pelo método de exclusão por azul de tripan (item 3.2.5.3) e na análise de compostos fenólicos. Para a análise de compostos fenólicos as culturas foram filtradas com bomba a vácuo, congeladas a -80°C , liofilizadas e armazenadas até a extração por maceração conforme item 3.2.5.2. Dois frascos por controle e por tratamento foram mantidos em sala de crescimento até o findar de 15 dias.

3.2.7 Caracterização fitoquímica das culturas de células de *Hyptis* spp. por HPLC-DAD

No presente estudo, foi realizada uma análise no HPLC-DAD para identificação e quantificação do composto AR presente nas culturas de células em suspensão de Hm e Hs eliciadas por AS, MeJ e EL. Um aparelho cromatográfico HPLC-DAD (Sistema LaChrom Elite® da VWR-Hitachi) constituído por uma bomba de duplo pistão modelo L-213, um detector de fotodiodos ("diode array") modelo L-2455, um forno de colunas modelo L-2300, um injetor de loop 20 μl e software EZChrom Elite foi utilizado para aquisição e processamento dos dados. Utilizou-se a metodologia de análise de HPLC pelo método de eluição por gradiente com coluna de fase reversa LiChrospher® RP-18 5 μm (250 x 4mm, Merck, Alemanha). A detecção foi realizada pelo detector por arranjo de diodos de 250-600 nm à temperatura de 25°C e os cromatogramas foram registrados em 260, 280 e 350 nm, para quantificação.

A fase móvel utilizada era composta por solvente A (água contendo ácido fórmico a 0,1% e solvente B (metanol com ácido fórmico a 0,1%). O fluxo do eluente usado foi de 0,8 ml/min, volume de injeção de 20 μl , e leitura nos comprimentos de onda foram de 260, 280 e 350nm. A eluição foi executada usando o gradiente descrito na tabela 3.1.

<i>Tempo (min)</i>	<i>Porcentagem de solvente (%)</i>	
	<i>% Solvente A</i>	<i>% Solvente B</i>
0	15	85
3	15	85
35	90	10
45	90	10
50	15	85

Tabela 3.1 – Gradiente de fase móvel utilizada no sistema cromatográfico para a determinação dos compostos fenólicos.

3.2.8 Caracterização fitoquímica de calos e células por espectrometria de massa

A biomassa de calos e células de Hm, Hp e Hs (liofilizadas e resuspensas em metanol 80%) foram analisadas em HPLC PerkinElmer®acoplado a espectrômetro de massas (PerkinElmer®Flexar SQ 300 MS, Waltham, Massachusetts, EUA) com quadrupolo único, injeção manual e fonte de ionização por electrospray (ESI), no modo negativo, controlado por meio do software Chromera. A temperatura de nebulização foi 350°C. O volume de injeção foi de 20µl. A separação dos compostos foi realizada em coluna C18 (NST 250mm x 4,6mm x 5µm) utilizando fase binária (solvente A: água+ácido acético 1%; solvente B: metanol absoluto) para as separações e forno a temperatura de 75°C. A corrida iniciou-se com 60% do solvente A e 40% do solvente B, evoluindo para 0% do solvente A e 100% do solvente B, dentro de 20 minutos. Permaneceu-se com 100% do solvente B por mais 5 minutos, voltando à condição inicial (60% solvente A e 40% solvente B) para equilíbrio por 2 minutos. O tempo total de corrida foi de 25 minutos. As determinações quantitativa e qualitativa dos compostos foram realizadas automaticamente pelo equipamento a partir de padrões puros das substâncias de interesse. O padrão utilizado foi ácido rosmarínico. As curvas de calibração foram obtidas pelo método do padrão externo.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os algoritmos implementados no software Graph Pad Prism®versão 5.01 (San Diego, CA). Os dados obtidos foram expressos como média ± E.P.M. (Erro Padrão da Média) de três experimentos independentes (n=3) realizados em triplicata. A significância das diferenças entre as médias obtidas foi avaliada usando o test t de Student não pareado. A diferença com $p \leq 0.05$ foi considerada significativa.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Indução de calos e cultura de suspensão celular

No intuito de avaliar o potencial fitoquímico de culturas *in vitro* de *Hyptis*, aplicamos técnicas da cultura de tecidos vegetais para formação de plântulas, calos e cultura de células em suspensão. A partir

das sementes, obtiveram-se plântulas (Figura 3.2), cujas as folhas e segmentos caulinares foram usados como explantes. Estes na presença de reguladores de crescimento exógenos (ANA 13,4 μ M e BAP 4,4 μ M) aplicados ao meio de cultura, reagiram satisfatoriamente em termos de indução de calos (Figura 3.3) e culturas de suspensão celular de *Hyptis*. A indução de calos de Hs a partir de meio MS suplementado com ANA e BA foi relatado por Veloz *et al.*, 2013 e Andrade *et al.*, 2017a. Já Botrel e colaboradores (2010b) utilizaram 2,4-D e BA para formação de calos de Hm. Para Hp não foi encontrado nenhum registro.

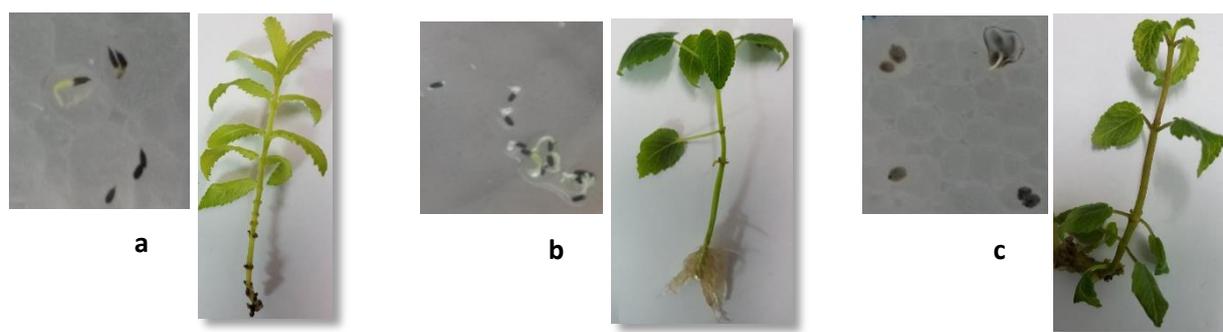


Figura 3.2 – Germinação de sementes e crescimento de plântulas de *H. marruboides* (a); *H. pectinata* (b) e *H. suaveolens* (c).

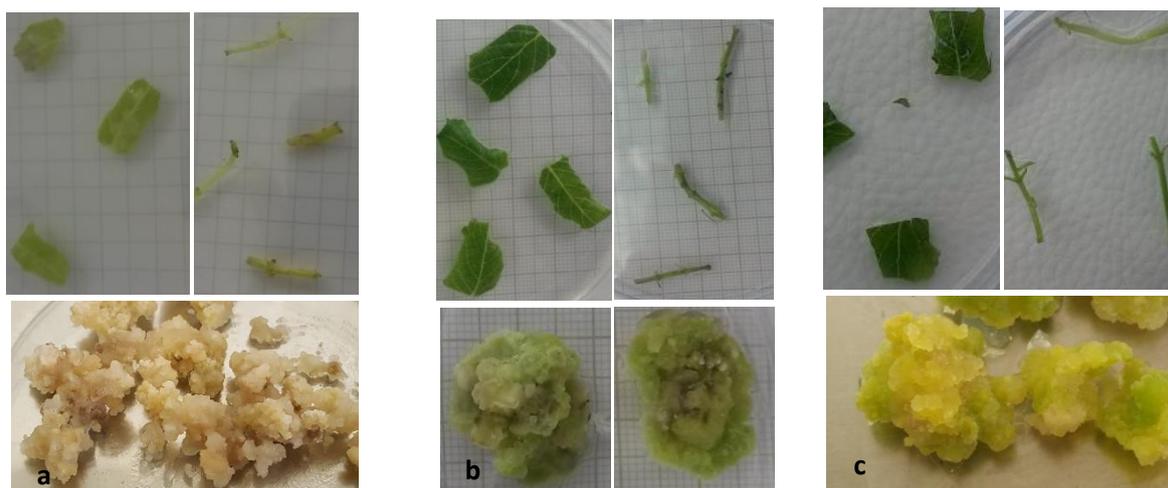


Figura 3.3 – Indução de calos por meio de folhas e segmentos caulinares de *H. marruboides* (a); *H. pectinata* (b) e *H. suaveolens* (c).

Todas as combinações hormonais de auxinas e citocinas formaram calos altamente proliferativos para as três espécies (Tabela 3.2). Todavia, a princípio, calos totalmente friáveis para os três tratamentos só foram possíveis para as espécies Hm e Hs. Calos friáveis para Hp só foram possíveis após 2 anos de

cultivo e para o tratamento 3. Apesar dos tratamentos 2 e 3 apresentarem porcentagem de formação de calos significativamente semelhante para as três espécies, optou-se pelo tratamento 3 pela melhor aparência e dimensão dos calos.

Espécies	Concentração de auxina/citocinina em μM	Quantidade de placas	Quantidade de explantes/placa	Formação de calos (%)
Hm	2,4,D (4,5) + Cin (0,9)	09	05	65,67±1,20 a
	ANA (5,3) + BA (0,8)	09	05	76,67±0,67 b
	ANA (13,4) + BA (4,4)	09	05	84,33±0,88 bc
Hp	2,4,D (4,5) + Cin (0,9)	09	05	55,00±1,15 d
	ANA (5,3) + BA (0,8)	09	05	70,67±1,20 ab
	ANA (13,4) + BA (4,4)	09	05	84,33±0,88 bc
Hs	2,4,D (4,5) + Cin (0,9)	09	05	73,00±3,79 bd
	ANA (5,3) + BA (0,8)	09	05	83,67±0,88 bc
	ANA (13,4) + BA (4,4)	09	05	88,00±0,577 c

Tabela 3.2 - Porcentagem de calos formados a partir de explantes de *Hyptis* spp. cultivados em meio MS suplementados com diferentes concentrações de auxinas/citocininas. A coluna formação de calos (%) representa a média \pm E.P.M. considerando os resultados obtidos a partir de três experimentos independentes em triplicata. As médias de % de formação de calos são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,005$) pelo teste t, exceto aquelas marcadas com a mesma letra.

3.4.2 Determinação da curva de crescimento das culturas de suspensão celular, variação do pH e viabilidade celular, e quantificação de açúcares

A partir das culturas de suspensão celular de *Hyptis* spp. cultivadas em meio MS sem ágar, suplementado com BA/ANA, foi possível determinar a curva de crescimento celular e suas fases, como mostrado na Figura 3.4.

Identificaram-se seis fases na curva de crescimento (biomassa seca) de *Hyptis* spp. Do período 0 ao 2º dia, verificamos a presença da fase lag (I) com uma aparente adaptação das células que preparavam para divisão. Do 2º ao 5º dia verificamos a presença da fase log ou exponencial (II) marcada por uma intensa divisão celular e formação de células pequenas e, a seguir, do 5º ao 10º dia, a fase linear (III) em que a divisão continuou ativa, mas menos intensa e as células aumentaram de tamanho. Do 10º ao 15º dia, registrou-se a fase de desaceleração (IV), sendo que o 15º dia foi o período onde houve a máxima acumulação de biomassa, com média de 497 mg.frasco⁻¹ para Hm, 410 mg.frasco⁻¹ para Hp e 388 mg.frasco⁻¹ para Hs. Pressupõe-se que nessa fase houve uma possível redução na divisão celular.

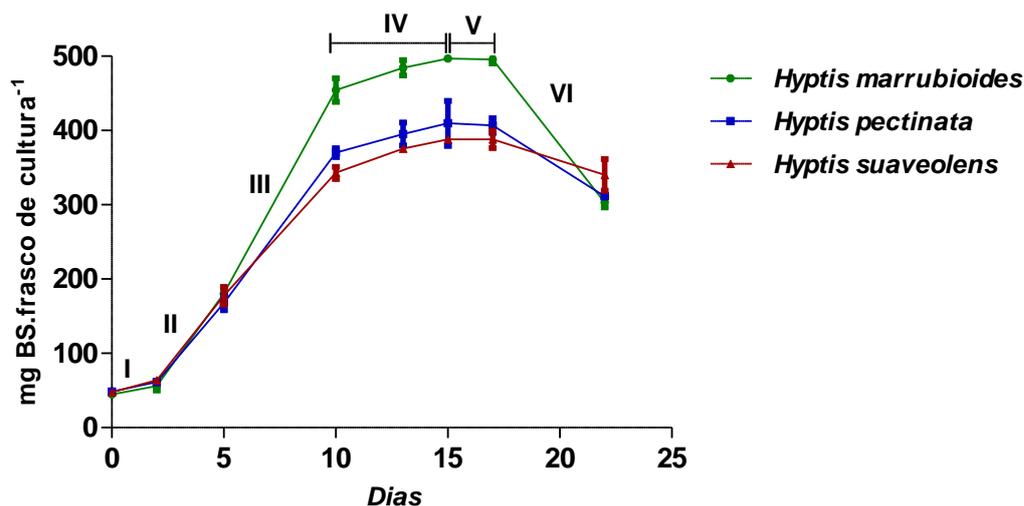


Figura 3.4 – Fases da curva de crescimento das culturas de suspensão celular de *Hyptis* spp em Meio MS sem ágar, suplementado com BA/ANA (4,4 μ M e 13,4 μ M). As barras verticais representam a média \pm E.P.M. considerando os resultados obtidos a partir de três experimentos independentes e em triplicata.

Do 15^o ao 17^o dia, o número de células se manteve constante, caracterizando a fase estacionária ou sem crescimento (V). Por último, do 17^o ao 22^o, a fase de declínio (VI) onde observamos uma diminuição significativa da viabilidade celular (Tabela 3.3), motivada provavelmente pelo consumo total de algum(ns) nutriente(s) essencial(is).

Dias	Hm		Hp		Hs	
	ph	% viabilidade	ph	% viabilidade	ph	% viabilidade
0	5,20 \pm 0,01	90,50 \pm 3,23 a	5,20 \pm 0,01	92,00 \pm 1,08 a	5,18 \pm 0,00	89,75 \pm 2,78 a
2	5,20 \pm 0,06	92,25 \pm 1,89 ab	5,33 \pm 0,03	92,75 \pm 1,03 ab	5,23 \pm 0,01	92,50 \pm 1,04 ab
5	5,27 \pm 0,09	92,00 \pm 0,91 abc	5,50 \pm 0,04	94,00 \pm 1,00 abc	5,32 \pm 0,04	92,25 \pm 1,31 abc
10	5,48 \pm 0,05	95,00 \pm 1,08 abcd	5,53 \pm 0,01	93,75 \pm 1,60 abcd	5,63 \pm 0,02	95,50 \pm 1,04 abcd
13	5,76 \pm 0,17	94,00 \pm 1,08 abcde	5,77 \pm 0,02	94,25 \pm 0,85 abcde	5,60 \pm 0,02	94,25 \pm 0,95 abcde
15	5,72 \pm 0,11	93,00 \pm 0,41 abcdef	5,58 \pm 0,07	94,75 \pm 0,75 abcdef	5,48 \pm 0,04	94,00 \pm 0,82 abcdef
17	5,75 \pm 0,09	80,00 \pm 2,04	5,74 \pm 0,11	86,75 \pm 0,63	5,64 \pm 0,07	82,75 \pm 0,48 e
22	5,75 \pm 0,08	57,50 \pm 2,46	5,86 \pm 0,08	60,25 \pm 1,65	5,66 \pm 0,04	58,25 \pm 1,49

Tabela 3.3 - Valores do ph e percentual de viabilidade celular durante um ciclo de crescimento de culturas de células. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. considerando os resultados obtidos a partir de três experimentos independentes. As médias por coluna de % de viabilidade são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,005$) pelo teste t, exceto aquelas marcadas com a mesma letra.

O foco da curva de crescimento é a identificação da fase de desaceleração, que marca o momento exato em que as células devem ser subcultivadas para o estabelecimento das suspensões

celulares (Santos *et al.*, 2010). Desta forma, as culturas de *Hyptis* devem ser repicadas no período do 10 ao 15º dia.

Quanto ao pH do meio líquido da cultura, oscilações ao longo das fases da curva de crescimento foram percebidas (Tabela 3.3). O pH inicial estava entre 5,18 a 5,20 e foi elevando aos poucos até a faixa de 5,66 a 5,86 no 22º dia para as três espécies. Conforme Farjaminezhad e colaboradores (2013), com o crescimento celular e o aumento da densidade celular, é normal o pH do meio de cultura também aumentar. Essa flutuação pode ser resultado da influência de diversos fatores como hidrólise, quebra enzimática, foto-oxidação e fotólise em intermediários sensíveis à luz (Celedón *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2014).

A variação nas taxas de consumo de sacarose e seus componentes monossacarídeos, glucose e frutose, importantes fornecedores de carbono para células não fotossintéticas, foi representada graficamente na figura 3.5.

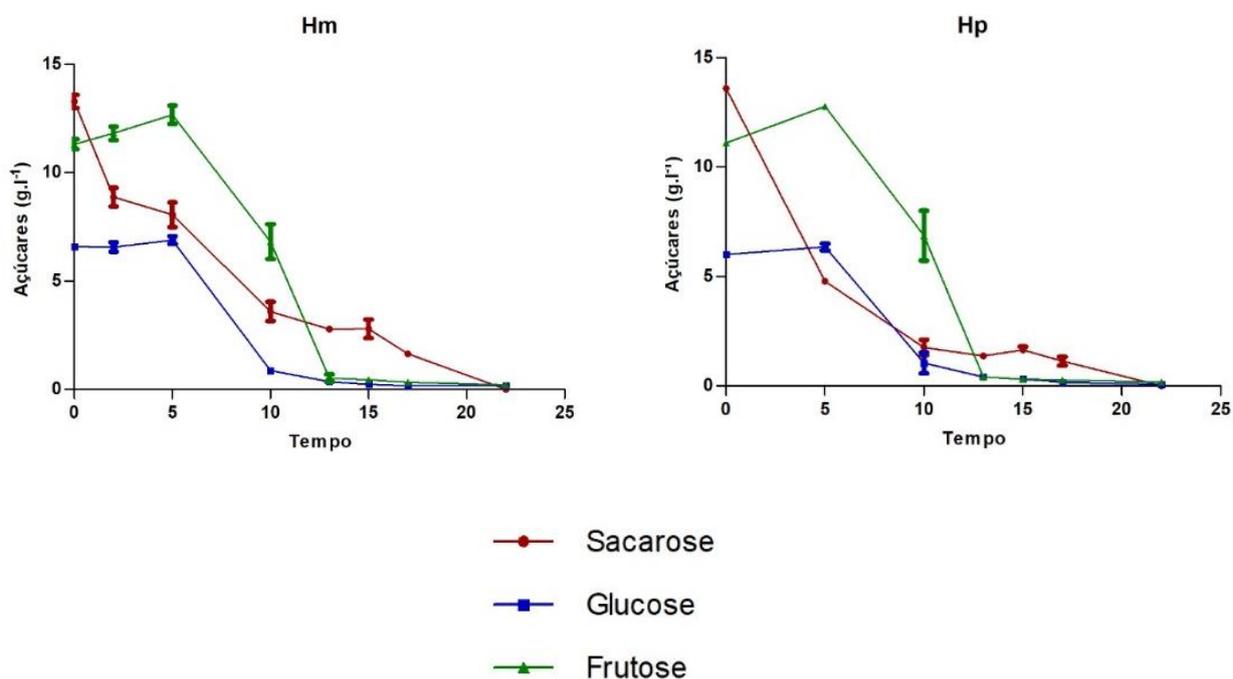


Figura 3.5 - Variação nas taxas de consumo de sacarose e seus componentes monossacarídeos, glucose e frutose em culturas de suspensão celular de *Hyptis* spp. As barras verticais representam a média \pm E.P.M. considerando os resultados obtidos a partir de três experimentos independentes. (Hm) *Hyptis marruboides* e (Hp) *Hyptis pectinata*. *Hyptis suaveolens* não foi avaliada quanto as taxas de consumo de sacarose, frutose e glicose.

Os açúcares como a principal fonte de carbono para células não fotossintéticas são utilizados para manter a maioria das atividades biológicas e fisiológicas controlando a síntese e a liberação de produtos secundários nos meios de cultura (Lamboursain e Jolicoeur 2005). Estabeleceu-se uma

comparação entre a curva de crescimento e as variações nas taxas de consumo de açúcar. No momento 0 da fase lag notou-se uma alta taxa de sacarose, oriunda do meio de cultura, e a presença de frutose e glucose resultantes da hidrólise da sacarose durante a esterilização em autoclave à alta temperatura. Entre o período 0 ao 2º dia, marcado por uma intensa atividade metabólica, observou-se uma diminuição da sacarose (33,3% Hm e 26% Hp) e, conseqüente, aumento da frutose (6,3% Hm e 4,4% Hp) e glucose (0,4% Hm e 2,5% Hp). Entre o 2º e 5º dia, fase log, houve uma redução de 9,2% de sacarose e incremento de 7,2% de frutose e 5% glucose. Para Hp, a sacarose foi reduzida em 52,7% enquanto a frutose e glucose aumentaram 8,3% e 3,3%, respectivamente. A diminuição da concentração de sacarose e aumento da concentração de frutose e glucose, sugere a presença da enzima invertase, localizada na parede celular. Essa enzima atua como catalisadora na clivagem da sacarose em monossacarídeos frutose e glucose (Lutterbach e Stöckigt, 1994; Kretzschmar *et al.*, 2007; Mucciarelli *et al.*, 2009).

No 10º dia, fase linear, sacarose, glucose e frutose demonstraram um declínio acentuado, chegando a 63,4%, 83,5% e 46,3% respectivamente, para Hp e 55,3%, 87,5% e 46%, respectivamente, para Hm. Na fase de desaceleração, a sacarose continua declinando, só que agora a uma taxa menor, enquanto que, a glucose e frutose tem uma alta diminuição para Hp (71,4% e 95,6%, respectivamente) e Hm (73% e 94%, respectivamente). Na fase estacionária, os níveis de açúcares estavam escasseando e a atividade metabólica decrescendo. No 22º dia, fase de declínio, verificou-se o esgotamento da sacarose, frutose e glucose nas culturas de Hm e Hp com conseqüente declínio da biomassa e da viabilidade celular.

3.4.3 Eliciação das culturas de suspensão celular e análise em HPLC-DAD

Neste estudo, optamos por realizar as eliciações das *Hyptis* durante a fase linear. Dessa forma, adicionamos eliciadores bióticos (extrato de levedura) e abióticos (AS e MeJ) no 8º dia da cultura de células em suspensão. Krzyzanowska e colaboradores (2011) observaram que o acúmulo de AR em culturas de suspensão celular de *Mentha piperita* sofria variações de acordo com a fase do ciclo de crescimento celular, sendo que sua concentração aumentava entre o sexto e oitavo dia da fase linear. Assim, optaram por adicionar os elicitores ácido jasmônico e jasmonato de metila na fase linear e verificaram um acúmulo de 1,5 vezes maior de AR em comparação com a amostra controle, sem elicitación.

Estudos de eliciação de culturas de células em suspensão com AS, MeJ e EL têm se destacado, conforme a literatura, como uma alternativa eficaz a induzir e/ou aumentar a produção de metabólitos secundários de interesse comercial (Nafie *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2012; Chung *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018). Neste caso, os eliciadores funcionam como moléculas sinalizadoras capazes de ativar uma cascata de transdução de sinal que leva à ativação e expressão de genes relacionados à biossíntese de metabólitos secundários em células vegetais e, eventualmente, em plantas *in vivo* (Zhao *et al.*, 2005; Conceição *et al.* 2006, Nafie *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2018).

Há diversos registros de uso dos eliciadores EL, MeJ e AS para aumentar a acumulação de certos compostos de interesse em plantas inteiras, calos, *hairy roots* e culturas de células em suspensão. Desta forma, verificou-se que o extrato de levedura quando usado como eliciador foi capaz de induzir a síntese de alcalóides da benzofenantridina em culturas celulares de *Eschscholtzia californica* (Byun e Pedersen, 1993); fitoalexinas sesquiterpenoides (capsidiol e debneyol) em culturas “*hairy roots*” de *Nicotiana tabacum* (Wibberley *et al.*, 1994); ácido chiquímico, precursor precoce da via dos fenilpropanoides (Broeckling *et al.*, 2005); silimarina em culturas de células *Silybum marianum* (Sánchez-Sampedro *et al.*, 2005); tanshinona em culturas “*hairy roots*” de *Salvia miltiorrhiza* (Yan *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2007). O eliciador metil jasmonato foi capaz de induzir a síntese de cumarina em culturas de células de salsa (Kauss *et al.*, 1992); fitoalexinas (lubimin, solavetivona, 3-hidroxisolavetivona) em culturas “*hairy roots*” de *Hyoscyamus albus* (Kuroyanage *et al.*, 1998); paclitaxel (taxol) e outros taxóides em culturas de células de *Taxus canadenses* e *Taxus cuspidata* (Ketchum *et al.*, 1999); beta-thujaplicin em culturas celulares de *Cupressus lusitânica* (Zhao *et al.*, 2001); 3-indolilmetilglucosinolato em plantas *Arabidopsis* (Brader *et al.*, 2001); beta-amirina triterpeno (um precursor das saponinas triterpênicas) em culturas de células de *Medicago truncatula* (Broeckling *et al.*, 2005); silimarina em culturas de células *Silybum marianum* (Sánchez-Sampedro *et al.*, 2005); saponina em culturas de células de *Glycyrrhiza glabra* (Hayashi *et al.*, 2003); estilbenoides em culturas celulares de *Vitis vinifera* (Shen *et al.*, 2012). Quanto ao ácido salicílico verifica-se a produção de quitinase em culturas de células de cenoura (Schneider-Müller *et al.*, 1994); azadiractina em culturas “*hairy roots*” de *Azadirachta indica* (Satdive *et al.*, 2007).

Para as plantas *Hyptis* identificou-se alguns estudos envolvendo técnicas de eliciação. Num deles, plântulas de *H. marrubioides* foram cultivadas *in vitro* sob diferentes comprimentos de onda (branco, azul, verde, vermelho e amarelo) e obtiveram um maior acúmulo de rutina com luzes azuis e brancas (Pedroso *et al.*, 2017). No outro estudo verificou-se que os eliciadores abióticos ácido salicílico

(SA) e nitrato de prata (SN) em concentrações de 30 μ M ou 60 μ M influenciaram o crescimento de plântulas de *Hyptis marruboides* e aumentam o teor de rutina *in vitro* (Pedroso *et al.*, 2019a).

Neste trabalho, o ácido fenólico AR, comumente encontrado em espécies da família *Lamiaceae* e *Boraginaceae* e possuidor de atividade antimicrobiana, foi o composto de interesse investigado por eliciação em culturas de células em suspensão de Hp e Hm com os eliciadores EL, MeJ e AS. Sabendo-se que a concentração do eliciador e a determinação do tempo de exposição a eliciação são fatores fundamentais que afetam o crescimento celular e o rendimento de metabólitos secundários (Wang *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2012), optou-se por testar diferentes concentrações de eliciador bem como avaliar o efeito do eliciador dentro de um período de 24hs e de 48hs.

Os derivados do ácido rosmarínico presentes na biomassa das culturas celulares eliciadas foram identificados via HPLC-DAD comparando o tempo de retenção, o espectro do composto e λ (nm) de absorção máxima para cada pico da amostra com o pico do composto padrão AR (Figura 3.6).

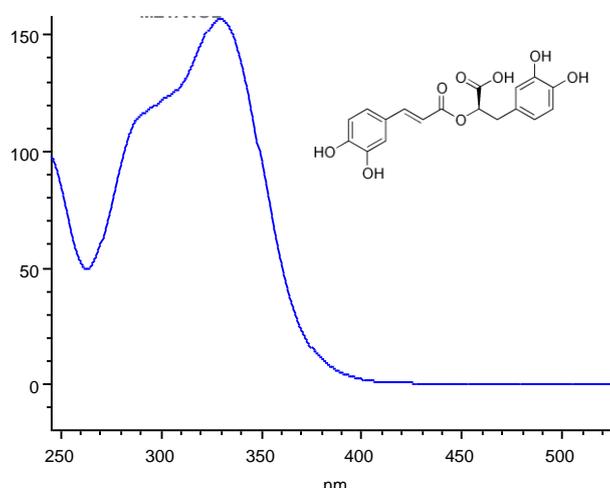


Figura 3.6 - Espectro do composto AR usado para identificação nas culturas de células em suspensão eliciadas com MeJ, AS e EL obtido por HPLC-DAD a 350nm. O composto apresentou tempo de retenção de 20,50 minutos com comprimento de onda de absorção máxima a 329 nm.

O efeito de eliciadores na viabilidade celular e na acumulação de AR e pode ser verificado nas Figuras 3.7 e 3.8. Conforme a Figura 3.9, observou-se um escurecimento das culturas de células em suspensão dentro de 24hs, após o tratamento com o eliciador. Este facto supõem-se ser indicativo de uma resposta hipersensível e eventual morte celular. Tal situação, não ocorreu nas amostras controle desprovida de eliciador. Culturas celulares de *Catharantus roseus* tratadas com eliciadores também apresentaram escurecimento (Namdeo *et al.*, 2008).

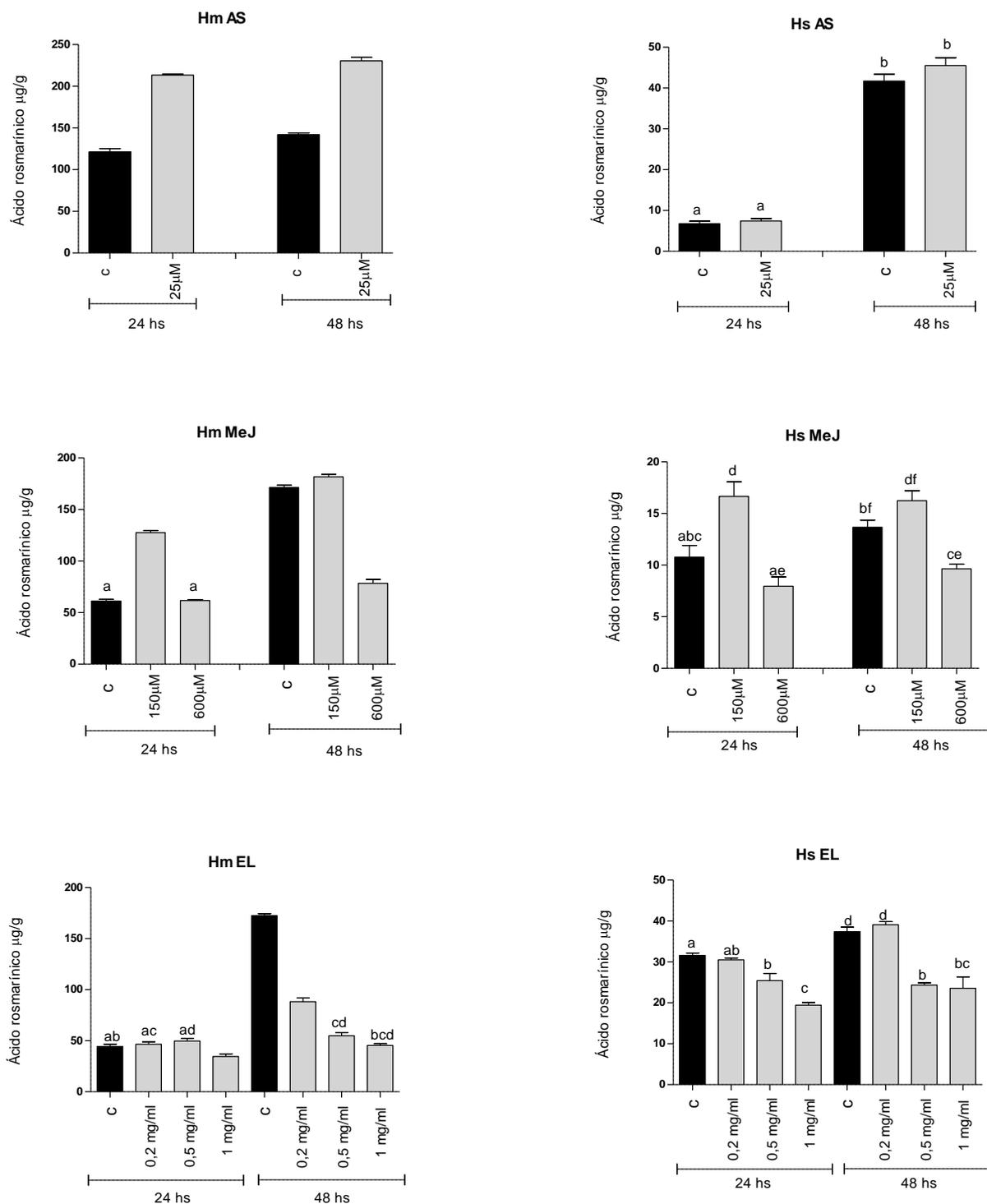


Figura 3.7 – Quantificação por HPLC-DAD de ácido rosmarínico em culturas de células em suspensão de *Hyptis* spp. em µg/g após eliciação. (C) controle com 24hs e 48hs; (Hm AS) eliciação de células em suspensão de Hm com ácido salicílico; (Hs AS) eliciação de células em suspensão de Hs com ácido salicílico; (Hm MeJ) eliciação de células em suspensão de Hm com metil jasmonato; (Hs MeJ) eliciação de células em suspensão de Hs com metil jasmonato; (Hm EL) eliciação de células em suspensão de Hm com extrato de levedura; (Hs EL) eliciação de células em suspensão de Hs com extrato de levedura. Cada coluna representa a média ± E.P.M. considerando os resultados obtidos a partir de três experimentos independentes. Todos os valores relacionados são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,005$) pelo teste t, exceto aqueles marcados com a mesma letra, no mesmo gráfico.

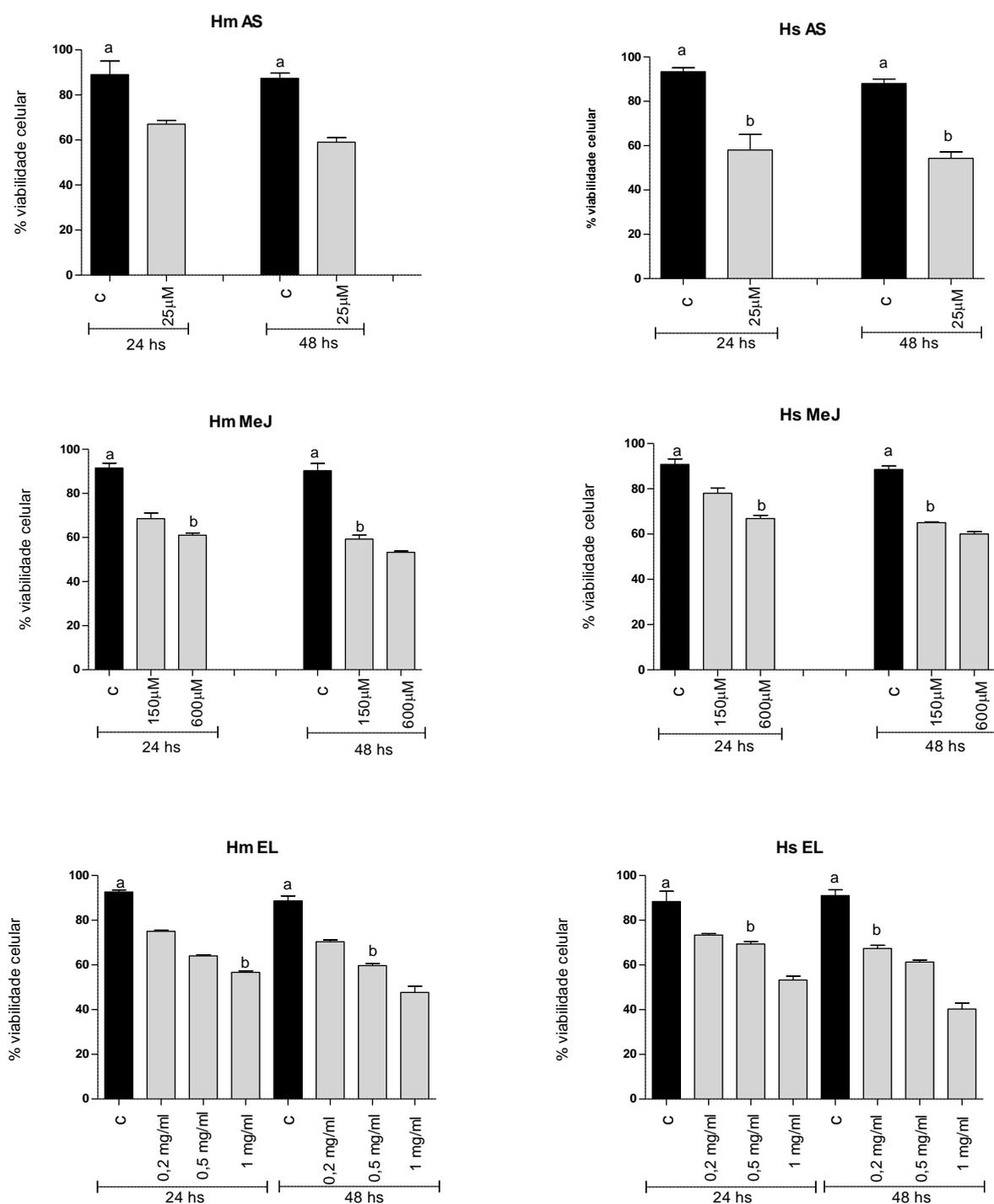


Figura 3.8 – Porcentagem de viabilidade celular em culturas de células em suspensão de *Hyptis* spp. antes e após eliciação via método azul de tripan. (C) Controle; (Hm AS) eliciação de células em suspensão de *H. marruboides* com ácido salicílico; (Hs AS) eliciação de células em suspensão de *H. suaveolens* com ácido salicílico; (Hm MeJ) eliciação de células em suspensão de *H. marruboides* com metil jasmonato; (Hs MeJ) eliciação de células em suspensão de *H. suaveolens* com metil jasmonato; (Hm EL) eliciação de células em suspensão de *H. marruboides* com extrato de levedura; (Hs EL) eliciação de células em suspensão de *H. suaveolens* com extrato de levedura. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. considerando os resultados obtidos a partir de três experimentos independentes. Todos os valores relacionados são estatisticamente diferentes ($p < 0,005$) pelo teste t, exceto aqueles marcados com a mesma letra.

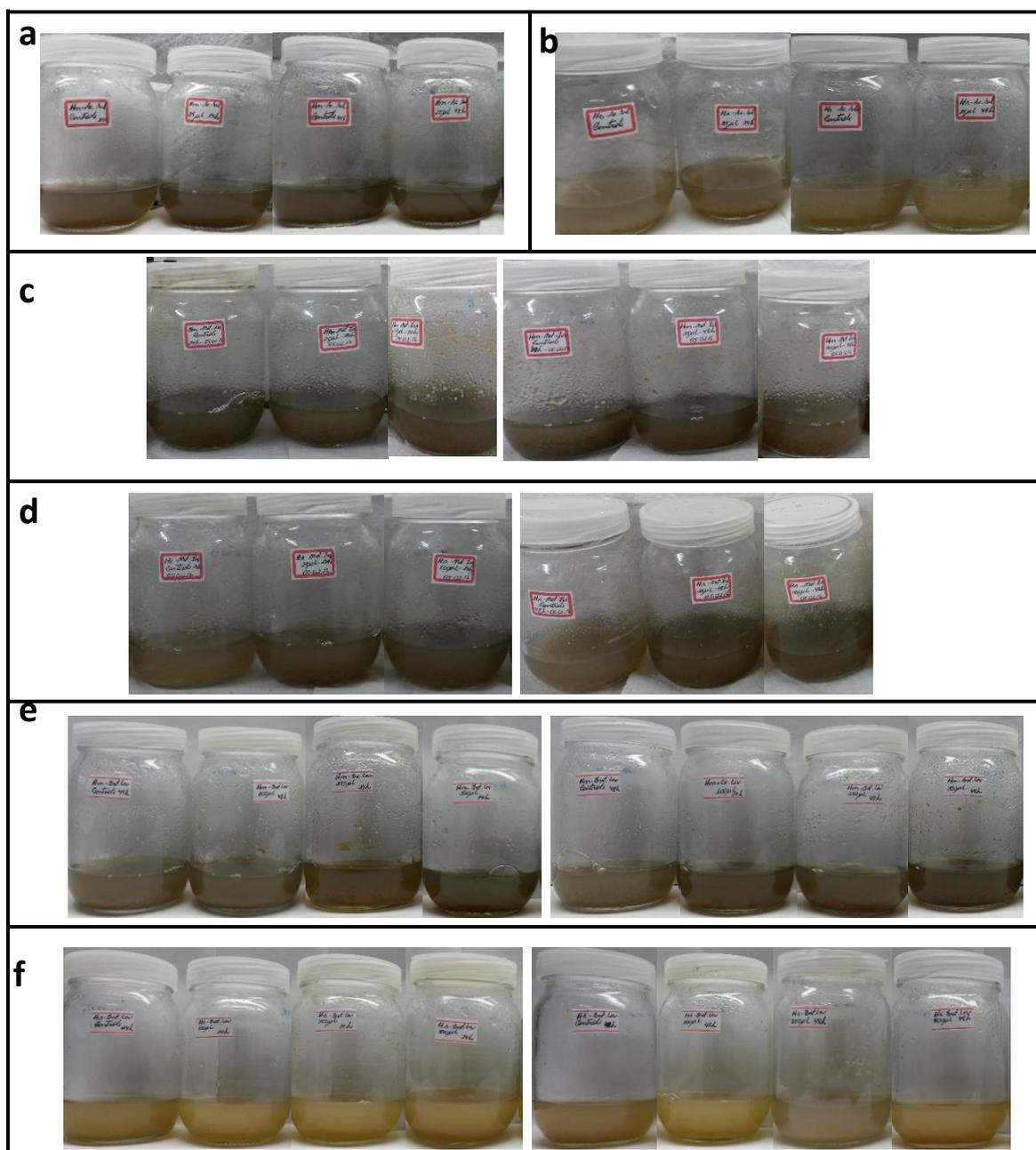


Figura 3.9 - Fotos dos tratamentos de eliciação realizados com as plantas Hm e Hs. a) Eliciação de Hm com ácido salicílico 25 μ M com 24 e 48hs; b) Eliciação de Hs com ácido salicílico 25 μ M com 24 e 48hs; c) Eliciação de Hm com metil jasmonato 150 μ M e 600 μ M com 24 e 48hs; d) Eliciação de Hs com metil jasmonato 150 μ M e 600 μ M com 24 e 48hs; e) Eliciação de Hm com extrato de levedura 0,2mg/ml, 0,5mg/ml e 1mg/ml com 24 e 48hs.

Constatou-se que o eliciador extrato de levedura, nas concentrações 0,2mg/ml, 0,5mg/ml e 1mg/ml, não causou efeitos significativos para produção de AR em nenhuma das situações testadas para Hm e Hs. Também, observou-se que em todas as condições testadas com 600 μ M de MeJ, o nível

de produção de AR das amostras eliciadas ficaram bem próximos ou inferior ao grupo controle. Houve queda de viabilidade celular em ambas as situações. A partir destes resultados cogitou-se que as concentrações dos eliciadores podem não ter sido as ideais comprometendo a produção de metabólitos e a viabilidade celular. Namdeo (2007) afirmou que concentrações abaixo da condição ideal não são suficientes para ativar a síntese do metabolismo secundário e ao contrário, concentrações acima induzem uma resposta hipersensível, levando à morte celular.

Em contraste com os resultados das *Hyptis*, alguns estudos retratam uma produção significativa de AR eliciados com EL. Culturas de células em suspensão de *Orthosiphon aristatus* mostraram um forte aumento transitório das atividades enzimáticas da fenilalanina amônia liase (PAL) e da tirosina aminotransferase (TAT) precedente ao pico de acúmulo de AR, independente do estágio de crescimento (Sumaryono *et al.*, 1991). Mizukami e colaboradores (1992), confirmam o aumento da atividade da PAL em culturas de células em suspensão de *Lithospermum erythrorhizon* precedente a indução do acúmulo de AR que atingiu seu máximo em 24h. Num outro estudo desenvolvido por Mizukami e colaboradores (1993), as culturas de células de *L. erythrorhizon* eliciada por MeJ apresentaram resultados mais lentos e superiores a eliciação por EL quanto a indução de atividades de PAL e 4-hidroxifenilpiruvato redutase (HPR) e acúmulo de AR. Yan e colaboradores (2005), afirmaram que culturas *hairy roots* de *Salvia miltiorrhiza* eliciadas com EI, apresentaram acúmulo de AR dependente da dosagem do eliciador, sendo mais eficaz em doses mais altas.

Os tratamentos de Hs e Hm com 150µM de MeJ (24h) mostraram um rápido e significativo aumento de AR na faixa de 54,62% e 108%, respectivamente, enquanto que com 48h notou-se um aumento lento de AR a ponto de Hs se igualar ao grupo controle. Já o tratamento de Hm com 25µM de AS (24h e 48h) apresentou um aumento de aproximadamente 62% em comparação com o grupo controle. Todavia, Hs (24h e 48h) não apresentou diferenças do grupo controle. Em todas as situações percebeu-se escurecimento das culturas e diminuição da viabilidade celular ao longo do tempo. Esse rápido aumento de AR após eliciação também foi notado por outros investigadores. Em culturas em suspensão de *Coleus blumei* (Lamiaceae) tratadas com 100µM MeJ ocorreu um acúmulo de AR após 16 h a eliciação, sendo que os maiores teores foram medidos após 56h (Szabo *et al.*, 1999). Além disso, Szabo e colaboradores (1999), mostraram que os os efeitos do elicitor fúngico de *Pythium aphanidermatum* e de MeJ foram comparáveis e que atividade da enzima hidroxifenilpiruvato redutase pode ser crucial para o aumento da biossíntese de AR. Também houve aumento da acumulação de AR em culturas células de *Exacum affine* quando elevou-se a concentração de sacarose no meio, adicionou-

se o precursor fenilalanina e o eliciador MeJA (100µM) (Skrzypczak-Pietraszek *et al.*, 2014). Culturas *hairy roots* de *Momordica charantia* quando suplementadas com 100µM de AS aumentaram significativamente o teor de AR bem como de outros ácidos hidroxicinâmicos (ácido rosmarínico, ácidos clorogênico, ferúlico, cafeico, p-cumárico e t-cinâmico) e flavonóis (catequina, rutina, miricetina, naringenina, quercetina, kaempferol e biochanina) foi significativamente aumentada (Chung *et al.*, 2016). Dowom e colaboradores (2017) relataram que em seu estudo o EL e MeJA possuem considerável capacidade de estimular a produção ácidos fenólicos, como a AR, ácido caféico e ácido salvianólico nas culturas de rebentos regenerados de *Salvia virgata*. Tais resultados reforçam o pressuposto de que o AR é um composto de defesa constitutivo das plantas contra infecções microbianas e sua concentração nas células vegetais pode ser aumentada por fatores que simulam a ação de patógenos e promovam sua biossíntese sob estresse (Szabo *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2005).

Vários outros estudos demonstram a utilização de MeJ, AS e EL para aumento da produção de compostos fenólicos. Sák e colaboradores (2014) destacam a produção de polifenóis por culturas de células em suspensão de *Vitis vinifera* eliciadas com metil jasmonato e extrato de patógeno da videira *Phaeomonniella chlamydospora*. As culturas de suspensão celular de *Thevetia peruviana* eliciadas com AS (300 µM) e e MeJA (3 µM) obtiveram bons resultados para compostos fenólicos e flavonóides sugerindo um efeito indutor desses eliciadores na via metabólica dos fenilpropanóides e diferentes mecanismos de ação destes na cultura celular (Mendoza *et al.*, 2018). Li e colaboradores (2018), observaram o aumento significativo de polifenóis totais e flavonoides em brotos de feijão-arroz (*Vigna umbellata*) após tratamento com 100µmol de MeJ. A aplicação foliar de MeJ levou à obtenção de uvas com maior concentração de compostos fenólicos, independentemente da grande influência da variedade e fatores da estação de crescimento (Portu *et al.*, 2018). Plantas de Lovage (*Levisticum officinale*) com 21 dias tiveram um aumento de compostos fenólicos quando eliciadas com 10µM ácido jasmônico e 0,1% de extrato de levedura (Złotek *et al.*, 2019).

Acredita-se que a produção de AR e outros compostos fenólicos via eliciação está provavelmente associada com aumentos rápidos e transitórios nas atividades principais das enzimas da via fenilpropanoide/flavonoides, como fenilalanina amônia-liase (PAL), tirosina aminotransferase (TAT), 4-hidroxifenilpiruvato redutase (HPR), peróxidos (POD) e polifenoloxidase (PPO) (Gundlach *et al.*, 1992; Conceição *et al.*, 2006; Nafie *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2019). Todavia, os mecanismos de ação destas enzimas ainda são alvo de discussões.

O acúmulo de metabólitos secundários nos períodos iniciais após eliciação e sua redução com o aumento do tempo de exposição, tais como aconteceram com as *Hyptis*, também foram relatados por outros investigadores em outras espécies. Namdeo e colaboradores (2007) demonstraram que quando células de *Catharantus roseus* foram expostas a elicitores fúngicos houve um aumento na produção de ajmalicina após 48h de exposição e uma diminuição deste composto com o aumento do tempo de exposição para 96h. Para Riihwani e Shanks (1998), os níveis de lochnericina aumentam após 24h da adição do ácido jasmônico e diminuíram continuamente com o tempo igualando ao controle após 70h da eliciação.

Quanto ao escurecimento das culturas e a queda da viabilidade celular, destaca-se que concentrações de eliciadores adicionadas exogenamente nas culturas de *Hyptis* podem ter mediado respostas ao estresse que levaram a uma regulação negativa do crescimento e desenvolvimento (Gadzovska *et al.*, 2007). Tal situação foi relatada por Gadzovska e colaboradores (2007) em seu estudo com culturas de suspensões celulares de *Hypericum perforatum*. Estas uma vez tratadas com diferentes concentrações de ácido jasmônico (AJ) apresentaram escurecimento das culturas, formação de agregados celulares, produção de fenilpropanóides e naftodiantronas e efeitos sobre a viabilidade celular. Neste caso, a concentração de 50µM de AJ não causou variações significativas, mas níveis mais altos (100 e 250µM AJ) tornou a viabilidade celular dependente do tempo pós-eliciação chegando 65% aos 21 dias do tratamento. As relações entre o escurecimento da suspensão, a formação de agregados celulares e uma forte indução das vias metabólicas secundárias também foram descritos por Zhao e colaboradores (2005).

Estes resultados demonstram que a planta *Hyptis* tem potencial para aumentar a produção de metabólitos secundários via eliciação e que o tipo, a concentração e o tempo de exposição do eliciador configuram-se como os principais fatores capazes de afetar de forma positiva ou negativa a produção destes compostos, tal como o AR.

3.4.4 Espectrometria de massa de calos e células

O AR da biomassa de calos e células de Hm, Hp e Hs foi identificado comparando os tempos de retenção e massa molecular com o do padrão de referência (Figura 3.10 a Figura 3.16).

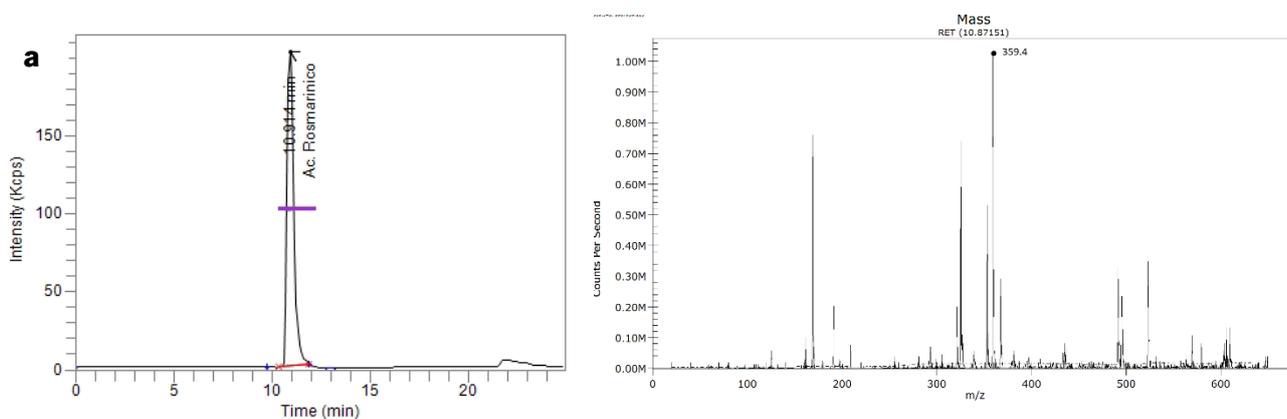


Figura 3.10 – Cromatograma e espectro de massas da solução padrão AR utilizada na análise por HPLC/Ms.

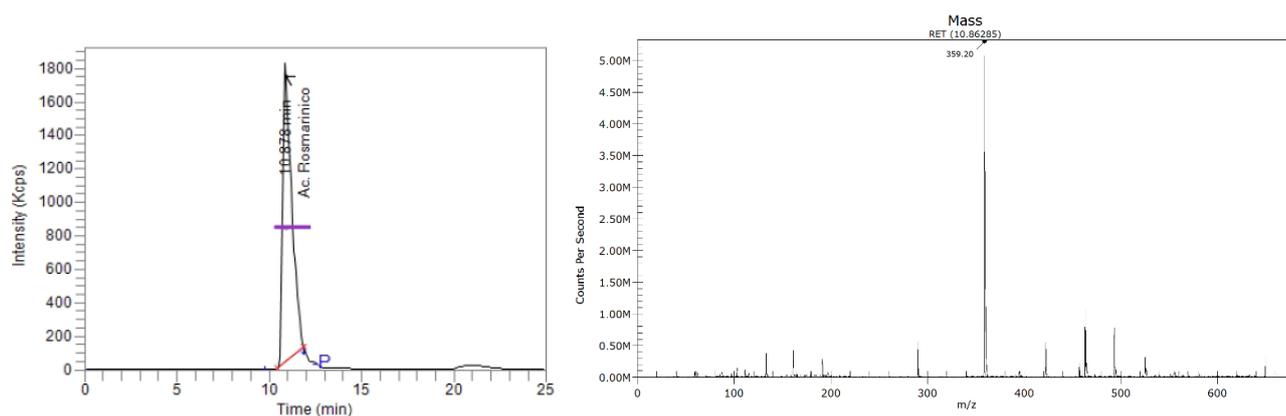


Figura 3.11 – Cromatograma e espectro de massa obtido para o composto AR na biomassa de calos de Hm utilizados em análise por HPLC/Ms.

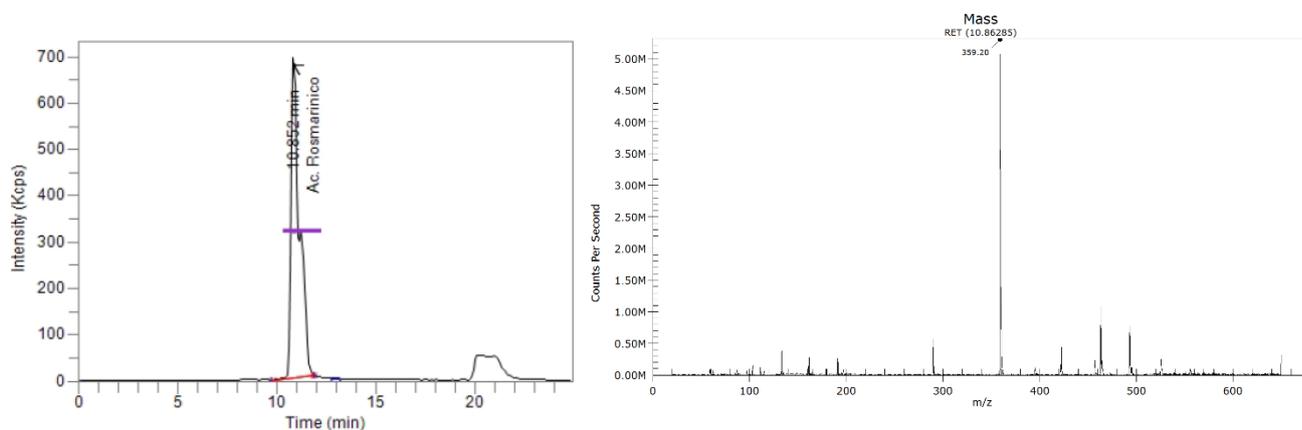


Figura 3.12 – Cromatograma e espectro de massa obtido para o composto AR na biomassa de calos de Hp utilizados em análise por HPLC/Ms.

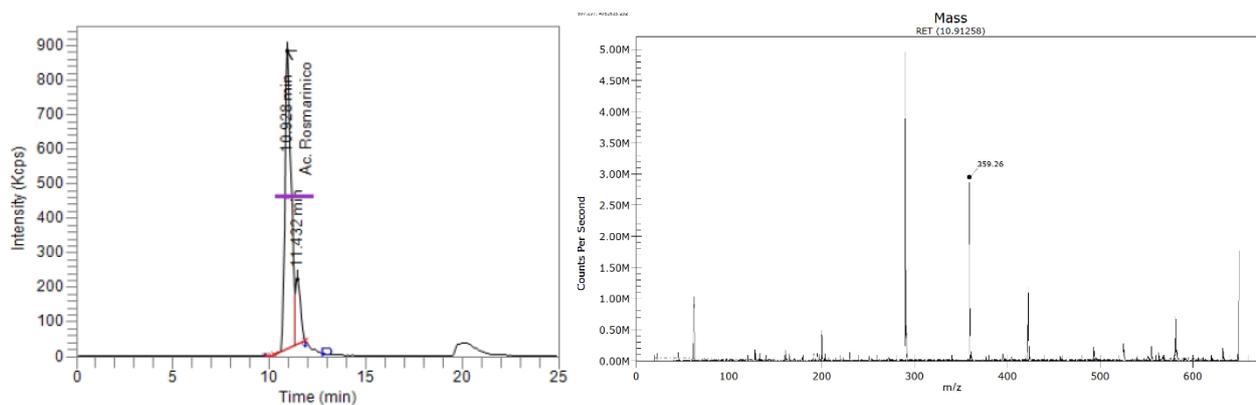


Figura 3.13 Cromatograma e espectro de massa obtido para o composto AR na biomassa de calos de Hs utilizados em análise por HPLC/Ms.

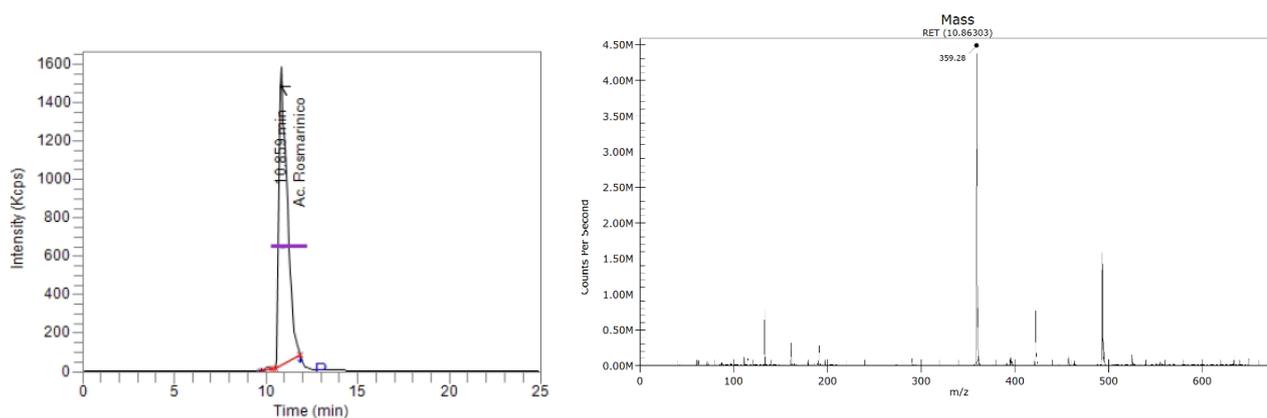


Figura 3.14 – Cromatograma e espectro de massa obtido para o composto AR na biomassa de células em suspensão de Hm utilizados em análise por HPLC/Ms.

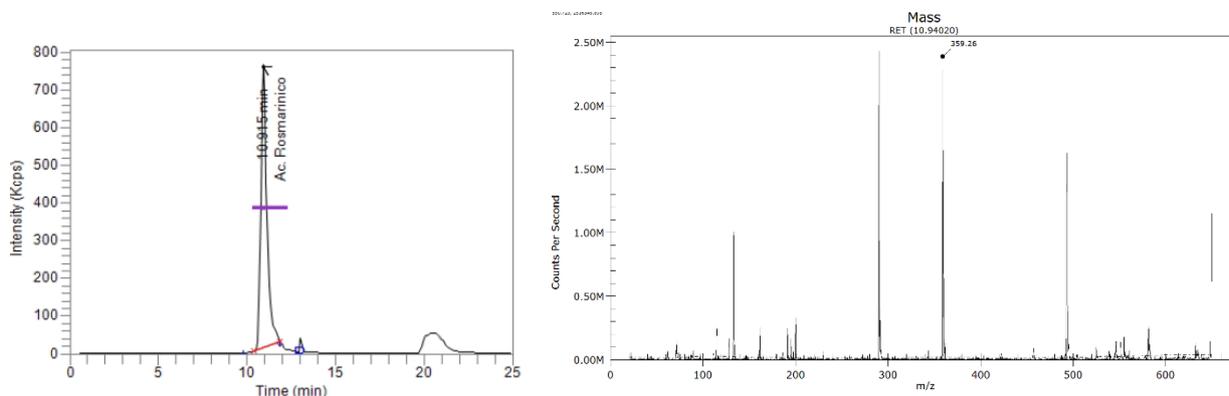


Figura 3.15 – Cromatograma e espectro de massa obtido para o composto AR na biomassa de células em suspensão de Hp utilizados em análise por HPLC/Ms.

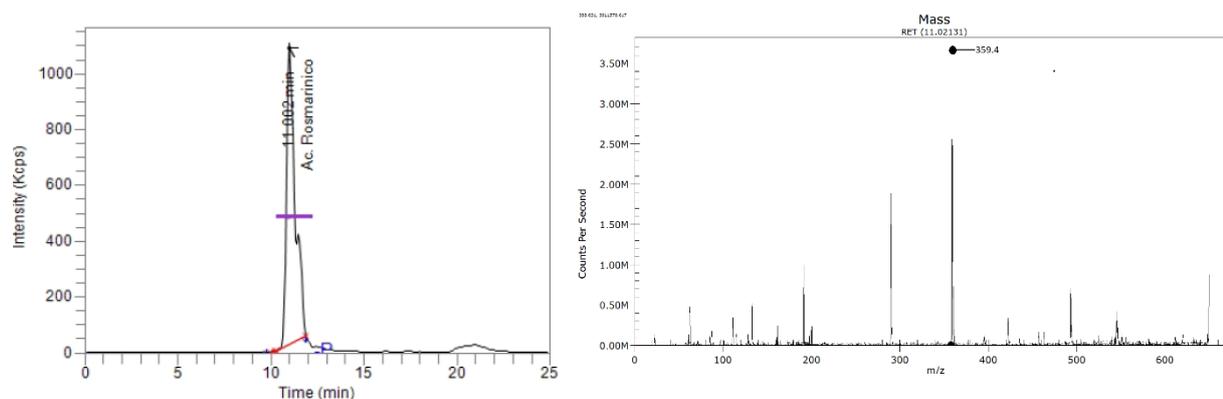


Figura 3.16 – Cromatograma e espectro de massa obtido para o composto AR na biomassa de células em suspensão de Hs utilizados em análise por HPLC/Ms.

A análise do perfil fitoquímico das culturas *in vitro* demonstrou a presença de composto fenólico da classe dos ácidos hidroxicinâmicos (AR) em todas as amostras de calos e células *Hyptis* (Tabela 3.4). Os resultados comprovaram que células indiferenciadas (calos e culturas de suspensões celulares) podem adquirir um grau de diferenciação a fim de produzir o metabólito secundário (Gadzoyska *et al.*, 2007) AR.

Composto	Amostras	Íon precursor [M-H] (m/z)	Tr (min)
Ácido rosmarínico	Biomassa de calos de Hm	359.4	10.86
	Biomassa de calos de Hp	359.4	10.86
	Biomassa de calos de Hs	359.4	10.91
	Biomassa de células em suspensão de Hm	359.4	10.86
	Biomassa de células em suspensão de Hp	359.4	10.94
	Biomassa de células em suspensão de Hs	359.4	11.02

Tabela 3.4 – Dados obtidos por HPLC-Ms do AR identificado na biomassa de calos e células (liofilizadas e resuspensas em metanol 80%). (Tr) tempo de retenção.

3.5 CONCLUSÃO

Na presente investigação, as técnicas de cultura de tecidos vegetais *in vitro* para micropropagação proporcionaram a produção de plântulas, calos e culturas de células em suspensão de Hm, Hp e Hs em meio Ms. Quanto a fitoquímica, verificou-se a presença do AR nos calos e na biomassa celular das culturas em suspensão das três espécies de *Hyptis*. Além disso, as culturas celulares de Hs eliciadas com MeJ e as de Hm eliciadas com MeJ e As obtiveram um aumento significativo no acúmulo

de AR. A concentração do eliciador e o tempo de incubação com eliciador mostraram-se fundamentais para o processo descrito. Portanto, a utilização da cultura *in vitro* associada ao uso de eliciadores pode ser uma alternativa para a exploração sustentável destas espécies como fonte de compostos biologicamente ativos para fins farmacológicos.

Capítulo 4

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS METANÓLICOS DE *Hyptis* spp.

4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS METANÓLICOS DE *Hyptis* spp.

4.1 INTRODUÇÃO

4.1.1. Determinação do potencial antioxidante dos extratos de *Hyptis* “*in vivo*” e “*in vitro*”

Para qualquer organismo aeróbio o oxigênio molecular (O₂) é fundamental ao seu metabolismo. No entanto, este mesmo metabolismo ocasiona a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que por serem altamente reativos podem interferir em reações normais do organismo e, quando em excesso, podem causar várias patologias, como câncer, aterosclerose, artrite, lesão do sistema nervoso central e distúrbios degenerativos (Uttara *et al.*, 2009; Birben *et al.*, 2012; Rahman, 2007). Contudo, as EROs não podem ser considerados totalmente vilões da espécie humana, visto que em quantidade baixas a moderadas desempenham papel importante em numerosos processos fisiológicos, incluindo a proliferação, defesa do hospedeiro, transdução de sinal e expressão gênica (Bae *et al.*, 2011; Nita *et al.*, 2016).

Em virtude deste “duplo” comportamento, há necessidade de um equilíbrio entre a produção de EROs e defesas antioxidantes da célula como condição essencial a homeostase do organismo. Desta forma, possíveis danos causados poderiam ser minimizados pela ação neutralizante de enzimas e moléculas não enzimáticas das células sem prejuízo das funções fisiológicas (Ferreira e Abreu, 2007; Barbosa *et al.*, 2010; Rahman, 2007). Porém, quando há uma geração excessiva de EROs ou um decréscimo na velocidade de remoção desses instaura-se um processo de desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes conhecido de estresse oxidativo (Ferreira e Abreu, 2007; Barbosa *et al.*, 2010).

O estresse oxidativo causa prejuízos a integridade de várias biomoléculas, incluindo lipídios, proteínas e DNA, com implicações em várias doenças como diabetes mellitus, doenças neurodegenerativas, artrite reumatóide, catarata, doenças cardiovasculares, doenças respiratórias, bem

como no processo de envelhecimento (Phaniendra *et al.*, 2015). Diante desta condição oxidativa, os danos poderiam ser diminuídos com uso de antioxidantes sintéticos amplamente empregados pela indústria alimentícia, cosmética e terapêutica como uma alternativa de combater o estresse oxidativo (Degáspari e Waszczynskij, 2004). Contudo, alguns antioxidantes sintéticos foram recentemente descritos como perigosos a saúde humana e a sua substituição por compostos naturais antioxidantes de baixo custo e não tóxicos seria uma opção mais barata, segura e desejada pelo consumidor (Lobo *et al.*, 2010). Nesse sentido, a prevalência de estudos direcionados a fitoquímicos bioativos, especialmente compostos fenólicos, que possam atuar isolados ou sinergicamente com outros aditivos, vem se tornando notória (Michalak, 2006; Sahoo *et al.*, 2013; Nowak *et al.*, 2018).

Hyptis é um importante gênero da família Lamiaceae com ampla distribuição na região do Cerrado Brasileiro e cujas espécies apresentam propriedades aromáticas e medicinais. Vários compostos fenólicos, dentre eles o ácido rosmarínico e alguns flavonoides, são comumente encontrados nesta família e podem conferir característica antioxidante às suas espécies com papel importante na redução do estresse oxidativo e na proteção contra várias doenças (Harley *et al.*, 2004; Justo *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2011; Roby *et al.*, 2013; Orlowska *et al.*, 2015; Tafurt-García *et al.*, 2015; Papuc *et al.*, 2016; Vieira e Orlanda, 2018).

As espécies *Hyptis marruboides* (Hm), *H. pectinata* (Hp) e *H. suaveolens* (Hs) são amplamente utilizadas na medicina popular para tratamento de dores, doenças de pele, cãibras e problemas gastrointestinais (Botrel *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2010a; Raymundo *et al.*, 2011; Andrade *et al.*, 2017a). Outras aplicações contra febre, infecções respiratórias, câncer, inflamações, foram relatadas para Hp e Hs (Raymundo *et al.*, 2011; Ghaffari *et al.*, 2014; Khonkarn *et al.*, 2015). Muitos estudos sobre a composição química dos seus óleos essenciais revelam a presença de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos, com variação química conforme variações nas condições ambientais e endógenas (Sales *et al.*, 2009; Botrel *et al.*, 2009; Nascimento *et al.*, 2008; Tonzibo *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2012; Jesus *et al.*, 2016; Martins *et al.*, 2006; Tafurt-Garcia *et al.*, 2015). Em contraste, pouquíssimos estudos se referem aos compostos fenólicos presentes em seus extratos. Quanto a ação biológica, investigações apontam significativa atividade antioxidante e estimulam o desenvolvimento de ensaios *in vivo* para sua validação (Andrade *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010; Deepika *et al.*, 2013; Ghaffari *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Bayala *et al.*, 2014; Serafini *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2018).

Pensando-se na descoberta de compostos promissores e, conseqüente, aumento da demanda por estas plantas medicinais, a utilização das técnicas biotecnológicas, como cultura de tecidos, seria uma alternativa atraente para multiplicação de plântulas *in vitro* em larga escala de forma contínua, rápida, usando pouco espaço e de modo sustentável com fins à biossíntese de metabólitos secundários (Sidhu, 2010). Isso porque, desde o início da utilização desta técnica, constatou-se que espécies vegetais cultivadas *in vitro* são dotadas da capacidade inerente de sintetizar metabólitos secundários valiosos semelhantes aqueles produzidos por suas espécies *in natura* (Siddiqui *et al.*, 2013). Dessa forma, a estimulação de pesquisas de culturas *in vitro* com as *Hyptis* poderia ser uma excelente estratégia de obtenção de metabólitos secundários com ação antioxidante a um custo-benefício melhor do que pelo método convencional de cultivo em campo. Além do mais, a micropropagação seria uma forma de garantir a conservação destas espécies de interesse (Pedroso *et al.*, 2019a).

No entanto, apesar do potencial medicinal das espécies *Hyptis*, ainda existem poucas evidências em relação ao seu perfil fitoquímico e atividade antioxidante e nenhum estudo comparativo entre os cultivos *in vivo* e *in vitro*. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar e comparar o perfil fitoquímico e a atividade antioxidante de extratos metanólicos de folhas de *Hyptis* (Hm, Hp e Hs) cultivadas *in vivo* com as cultivadas *in vitro*.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Coleta e processamento do material vegetal

4.2.1.1 Biomassa *in vivo* e *in vitro*

As folhas e sementes de Hm, Hp e Hs foram coletadas no campo experimental do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano (IFGoiano), Campus Rio Verde, nas coordenadas aproximadas de 17°48'3,81''S e 50°54'0,07''W; 17°48'3,94''S e 50°53'9,99''W e 17°48'3,81''S e 50°54'0,01''W, respectivamente, altitude de 727m, no período da manhã do dia 05 de março de 2014 (folhas) e 02 de agosto de 2014 (sementes).

As folhas foram secas em estufa de circulação de ar a 35°C, até peso constante para estabilização da biomassa. Posteriormente este foi moído em moinho de facas, acondicionado em sacos plásticos, selados, identificados e mantidos em câmara fria a -20°C. As sementes passaram por um processo de desinfecção para produção de plântulas axénicas conforme descrito no item 3.2.2 (Cap. 3). As plântulas estabelecidas foram congeladas, liofilizadas, trituradas, acondicionadas em tubos falcon 50ml, identificadas e armazenadas em câmara fria a -20°C.

4.2.2 Preparação de extratos metanólicos de *Hyptis* spp.

A biomassa vegetal de amostra *in vivo* e *in vitro* foi macerada em metanol na proporção de 1 grama de biomassa seca para 10 ml de metanol 80% (1:10), homogeneizada no ultrasonicador por 15 minutos e estocada por 5 dias no escuro e a temperatura ambiente. Esta solução foi filtrada, evaporada e liofilizada por 72 horas. Prepararam-se soluções estoque do extrato liofilizado dissolvendo-o em DMSO PA (dimetilsulfóxido) a 150mg/ml para *in vivo* e 40mg/ml para *in vitro*. Essa solução foi homogenizada no ultrasonicador por 15 minutos e a seguir, foi armazenada a temperatura de 4°C para posterior análise por HPLC-DAD-MS e em ensaios de bioatividade.

4.2.3 Caracterização fitoquímica dos extratos metanólicos por HPLC-DAD e espectrometria de massa

Usou-se o aparelho cromatográfico HPLC-DAD (Sistema LaChrom Elite® da VWR-Hitachi) nas mesmas condições descritas no item 3.2.7 (Cap.3) para identificação dos compostos presentes nos extratos metanólicos de folhas *in vivo* de Hm (ExMtHmVv), Hp (ExMtHpVv) e Hs (ExMtHsVv) e nos extratos metanólicos de folhas *in vitro* de Hm (ExMtHmVt), Hp (ExMtHpVt) e Hs (ExMtHsVt). Além do ácido rosmarínico, usou-se os padrões ácido clorogênico, quercetina, isoquercetina e luteolina-7-glucosídeo, kampferol. Já para análises de espectrometria de massas recorreu-se ao equipamento HPLC PerkinElmer® acoplado a espectrômetro de massas (PerkinElmer® Flexar SQ 300 MS) descrito no item 3.2.8.

4.2.4 Ensaios antioxidantes de *Hyptis* spp.

A atividade antioxidante dos extratos de *Hyptis* spp. foi avaliada, *in vitro*, por meio dos ensaios de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil), capacidade de quelação do íon ferro, inibição de produção do óxido nítrico, sequestro do ânion superóxido, inibição da oxidação do betacaroteno/ácido linoleico e poder de redução sobre o íon férrico (FRAP). Os ensaios antioxidantes foram realizados em microplacas de 96 poços visando reduzir a quantidades de reagentes e amostras necessárias, aumentar o número de análises simultâneas e otimizar o tempo e precisão das leituras por meio de equipamentos automatizados. O composto antioxidante padrão utilizado foi a quercetina (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one,3,3',4',5,6-pentahydroxyflavone), com $\geq 95\%$ (HPLC), fórmula química $C_{15}H_{10}O_7$ e peso molecular de 302,24 g/mol (Sigma-Aldrich).

4.2.4.1 Ensaio DPPH

Para determinar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos de *Hyptis* spp., recorreu-se ao método espectrofotométrico DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil, Sigma-Aldrich) descrito por Brand-Williams e colaboradores (1995), com modificações. Preparou-se uma solução de DPPH a 400 μ M em etanol 100% e adicionou-se a cada poço de uma microplaca, 140 μ l desta solução DPPH e 10 μ l de extrato a diferentes concentrações. Para o branco da amostra, substituiu-se a solução DPPH por 140 μ l de etanol 100% enquanto que para o controle substituiu-se os extratos por 10 μ l de etanol 100%. A reação foi monitorada do instante 0 até o instante 60 min no escuro e a temperatura ambiente por meio do leitor de microplacas SpectraMaxPlus a $\lambda=515$ nm. A porcentagem de redução do DPPH foi calculada com base na fórmula:

$$(\%) \text{ redução de DPPH} = \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100$$

onde, A_f – Absorbância registrada no estado de equilíbrio e A_i – Absorbância inicial registrada no tempo $t=0$ minuto.

A partir dos resultados obtidos da fórmula, construiu-se uma curva da porcentagem de redução do DPPH *versus* as concentrações de cada extrato visando a determinação do EC_{50} .

4.2.4.2 Ensaio da capacidade de quelação do ferro

Para testar a atividade quelante dos extratos metanólicos de *Hyptis*, usou-se o ensaio ICA adaptado de Dinis e colaboradores (1994). Soluções de FeSO₄ a 0,12mM em água ultrapura (Iron (II) sulfate heptahydrate 99%, Sigma-Aldrich) e ferrozina a 0,6mM em água ultrapura (3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid sodium salt, Sigma-Aldrich) foram previamente preparadas e protegidas da luz, antes e durante a realização dos ensaios.

A atividade quelante do extrato foi testada em uma microplaca acrescentando a cada poço 50µl de extrato a diferentes concentrações, 50µl de FeSO₄ e 50µl de Ferrozina. O controle e o branco diferenciaram-se pela substituição de extrato por água ultrapura e ferrozina por água ultrapura, respectivamente. Após adição de todos os reagentes, a microplaca ficou em repouso à temperatura ambiente e protegida da luz por 10 minutos. O reagente ferrozina (Fz), na presença do íon Fe²⁺, formou o complexo Fe (II) (Fz)₃, de cor rósea, cuja absorbância foi medida a 562nm usando um espectrofotômetro (modelo SpectraMaxPlus).

A porcentagem de atividade quelante do ferro (% ICA), foi calculada conforme a fórmula:

$$(\%) \text{ ICA} = \frac{Ac - (Aa - Ab)}{Ac} \times 100$$

onde, Ac – Absorbância do controle; Aa – Absorbância da amostra e Ab – Absorbância do branco da amostra.

Os valores de porcentagem de ICA foram plotados contra as concentrações dos extratos de *Hyptis*. A concentração necessária de amostra para reduzir a descoloração da ferrozina em 50% (EC₅₀) foi determinada graficamente.

4.2.4.3 Ensaio da capacidade de inibição da produção de óxido nítrico

A determinação da capacidade de interceptação do NO foi realizada utilizando-se solução de nitroprussiato de sódio (SNP, Merk), de acordo com a metodologia descrita por Green *et al.*, (1982), com modificações. Nos poços de cada microplaca relacionados as amostras e ao branco da amostra colocou-se 100µl de extrato a diferentes concentrações mais 100µl de SNP (a 20mM em água ultrapura). Para

o controle e o branco controle adicionou-se no lugar do extrato solução tampão H_3PO_4 (19mM em água deionizada, pH 7,4). Esperou-se uma hora e adicionou-se 100 μ l do reagente Griess (sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5% e naftildetilenodiamina a 0,1% em água ultrapura) no poço da amostra e no do controle e 100 μ l de solução tampão fosfato no branco da amostra e no branco controle. As placas ficaram em repouso e protegidas da luz por 10 minutos até serem analisadas no espectrofotômetro (modelo SpectraMaxPlus) a 562nm.

Os resultados são expressos em porcentagem de inibição da produção de nitrito (% NO) relativamente ao controle sendo calculada, conforme a fórmula:

$$(\%) \text{ inibição de NO} = \frac{(Ac - Abc) - (Aa - Aba)}{(Ac - Abc)} \times 100$$

onde, Ac– Absorbância do controle; Abc – Absorbância do branco do controle; Aa – Absorbância da amostra e Aba – Absorbância do branco da amostra.

Os valores de porcentagem do NO foram contrastados com as concentrações dos extratos de *Hyptis*. A concentração necessária de amostra para reduzir a descoloração do cromóforo em 50% (EC_{50}) foi determinada graficamente.

4.2.4.4 Ensaio da capacidade de sequestro do ânion superóxido

O ensaio da capacidade de intercepção do radical ânion superóxido pelos extratos metanólicos de *Hyptis* spp., foi realizado conforme a metodologia desenvolvida por Ewing e Janero, 1995. Para realização do ensaio foram previamente preparadas e protegidas da luz, soluções estoque de tampão fosfato a 19 mM em água deionizada e pH 7,4 (PanReac Química SLU), NBT (Nitrotetrazolium Blue chloride, Sigma-Aldrich) a 81,5 μ M em tampão, NADH (Disodium salt, Roche Custom Biotech) a 1,97mM em tampão e PMS (Phenazine methosulfate, Sigma-Aldrich) 16 μ M em tampão que foram armazenadas em gelo até o momento das análises.

Nos poços da microplaca relacionados às amostras colocou-se 50 μ l de extrato a diferentes concentrações, 50 μ l de NADH, 150 μ l NBT e 50 μ l PMS. O branco da amostra e o controle diferenciaram-se pela troca de PMS por tampão e extrato por tampão, respectivamente. Após 5 minutos de incubação sobre proteção da luz, procedeu-se a leitura da placa a 560nm.

Os resultados são expressos em porcentagem de inibição da produção de azul de nitrotetrazólio relativamente ao controle (% NBT) sendo calculados conforme a fórmula:

$$(\%) \text{ Inibição da produção de NBT} = \frac{Ac - (Aa - Aba)}{Ac} \times 100$$

onde, Ac– Absorbância do controle, Aa – Absorbância da amostra e Aba – Absorbância do branco da amostra.

Os valores de porcentagem do NBT foram contrastados com as concentrações dos extratos de *Hyptis* spp. A concentração necessária de amostra para reduzir a descoloração do cromóforo em 50% (EC₅₀) foi determinada graficamente.

4.2.4.5 Ensaio da inibição da oxidação do β-caroteno/ácido linoleico

O ensaio da oxidação do β-caroteno/ácido linoleico descrita por Prieto, *et al.*, 2012, foi utilizada para determinação da atividade antioxidante dos extratos de *Hyptis*. Para preparação da solução de uso β-caroteno, num balão de fundo redondo com junta esmerilhada e tampa, adicionou-se 4 mg de β-caroteno (β-carotene, Sigma-Aldrich), 4 g de tween 20 (tween® 20, Sigma-Aldrich), 0,5 ml de ácido linoleico (linoleic acid, Sigma-Aldrich) e 20 ml de clorofórmio (chloroform, Sigma-Aldrich). Levou-se o frasco, sempre protegido da luz, ao evaporador rotativo numa temperatura de 45°C para remoção do clorofórmio por período curto de tempo, evitando-se o início do processo de oxidação lipídica (Prieto *et al.*, 2012). Após remoção do clorofórmio, adicionou-se 30 ml de solução tampão Britton-Robinson (100mM, pH 6,5) para cada 1ml de resíduo oleoso e verificou-se a absorbância de aproximadamente 1,4 a 470 nm. O resíduo remanescente e a solução de trabalho foram armazenadas a -20°C por no máximo uma semana, até a realização do ensaio.

Para os poços da microplaca relacionados a amostra utilizou-se 50 µl de extrato a diferentes concentrações e 250 µl de solução de uso β-caroteno. Para os poços relacionados ao branco da amostra e ao controle substituiu-se a solução de uso por solução Britton e extrato por solução Britton, respectivamente. As microplacas foram incubadas a 45°C durante 60 min. A descoloração do β-caroteno pelos radicais gerados da oxidação espontânea do ácido linoleico a 45°C foi monitorada pelo decréscimo da absorbância medida pelo espectrofotômetro a 470 nm, do tempo 0 até o fim de 60 minutos.

A porcentagem de inibição da oxidação β -caroteno/ácido linoleico foi calculada com base na fórmula:

$$(\%) \text{ Inibição da oxidação} = \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100$$

onde, A_f – Absorbância registrada no estado de equilíbrio e A_i – Absorbância inicial registrada no tempo $t=0$ minuto.

A partir dos resultados obtidos da fórmula, construiu-se uma curva da porcentagem de inibição da oxidação *versus* as concentrações de cada extrato visando a determinação do EC_{50} .

4.2.4.5 Ensaio FRAP

O ensaio FRAP para determinação do EC_{50} dos extratos de *Hyptis* spp. foi feito de acordo com Tseng *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2017, com adaptações. A solução oxidante FRAP, denominada reagente FRAP, foi preparada com adição de solução tampão de acetato (PanReac) a 300 mM e pH 3,6, solução de TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine, Sigma-Aldrich) a 10mM dissolvida em HCl (Hydrochloric acid, Sigma-Aldrich) a 40mM e solução de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Iron(III) chloride hexahydrate, Sigma-Aldrich) a 20mM na proporção de 10:1:1.

Para realização do ensaio acrescentou-se em cada poço da microplaca, 20 μ l de extrato a diferentes concentrações, 15 μ l de H_2O , 150 μ l reagente FRAP pré-aquecido a 37°C. O branco da amostra e o controle diferenciaram-se pela troca de reagente FRAP por água ultrapura e extrato por tampão acetato, respectivamente. Após 4 minutos de incubação sobre proteção da luz, verificou-se a redução do ferro (III) a ferro (II) com consequente mudança de cor azul claro nos poços para azul escura (figura 4.7) e procedeu-se a leitura da placa a 593nm. O aumento da absorbância representou o poder redutor dos antioxidantes. O valor EC_{50} correspondeu a concentração efetiva na qual a absorbância foi de 0,500 para redução do Fe^{3+} obtido pela plotagem dos valores de absorbância *versus* as concentrações dos extratos de *Hyptis*.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os algoritmos implementados no software Graph Pad Prism® versão 5.01 (San Diego, CA). O programa é implementado com equações integradas para regressão não linear que, por meio de cálculos matemáticos, geram um ajuste de curva mais preciso aos pontos dados permitindo obter a EC_{50} (Chen *et al.*, 2013). Os dados obtidos foram expressos como média \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média) de três experimentos independentes (n=3) realizados em triplicata. A significância das diferenças entre as médias obtidas foi avaliada usando o test t de Student não pareado. A diferença com $p \leq 0.05$ foi considerada significativa.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Análise em HPLC-DAD e HPLC-DAD-MS

A figura 4.1 mostra o perfil de compostos fenólicos dos extratos metanólicos de folhas *in vivo* de Hm (ExMtHmVv), Hp (ExMtHpVv) e Hs (ExMtHsVv) e dos extratos metanólicos de folhas *in vitro* de Hm (ExMtHmVt), Hp (ExMtHpVt) e Hs (ExMtHsVt) registrado a 350nm.

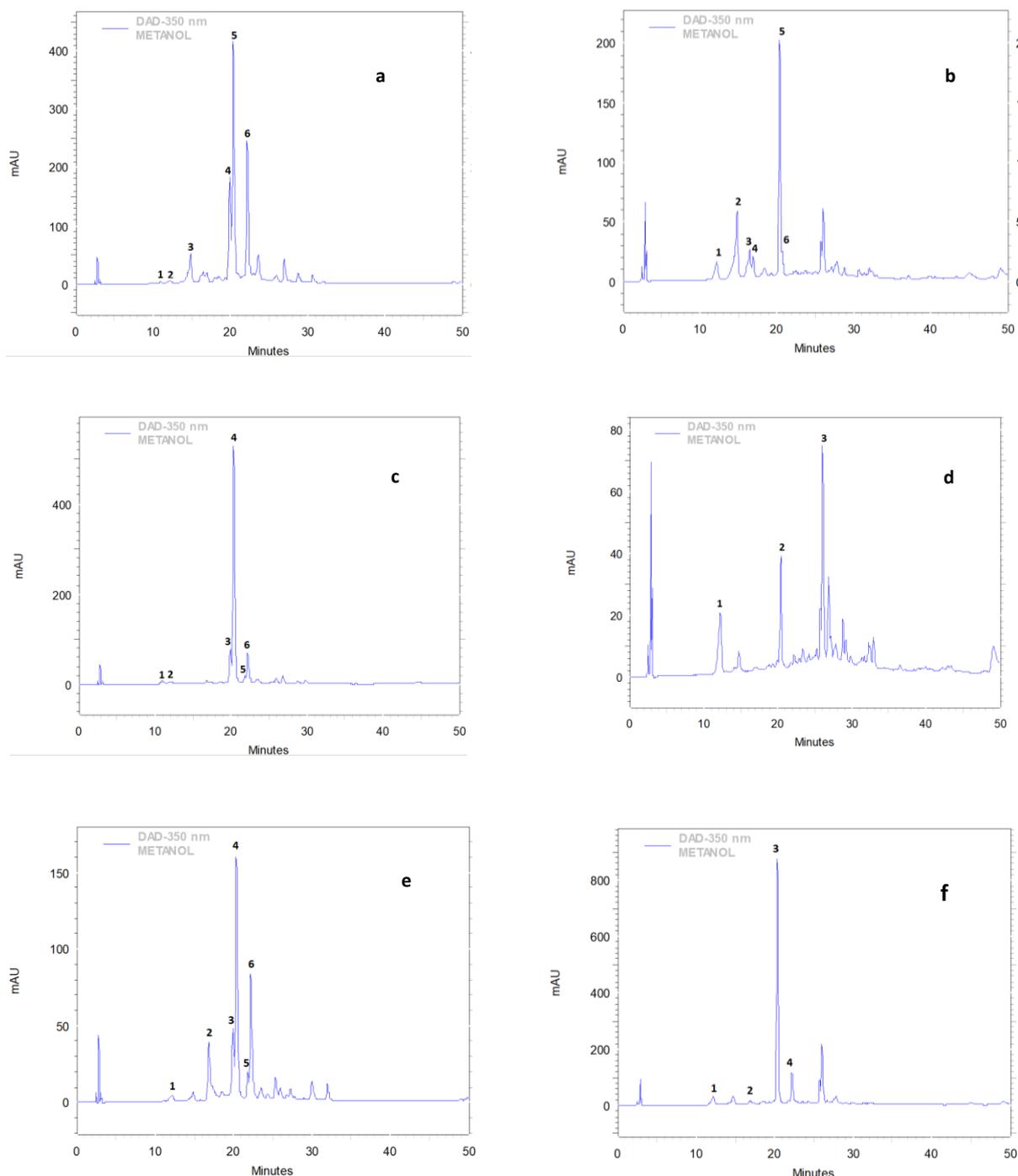


Figura 4.1 – Cromatograma dos extratos etanólicos de folhas de *H. marruboides* (a), *H. pectinata* (c) e *H. suaveolens* (e) a concentração de 100 µg/ml “*in vivo*” e *H. marruboides* (b), *H. pectinata* (d) e *H. suaveolens* (f) a concentração de 40 µg/ml “*in vitro*” obtidos por HPLC-DAD a 350nm.

Os compostos fenólicos foram identificados comparando o espectro UV-Vis, o seu tempo de retenção e λ (nm) de absorção máxima para cada pico dos extratos com os dos compostos padrões de referência (figura 4.2).

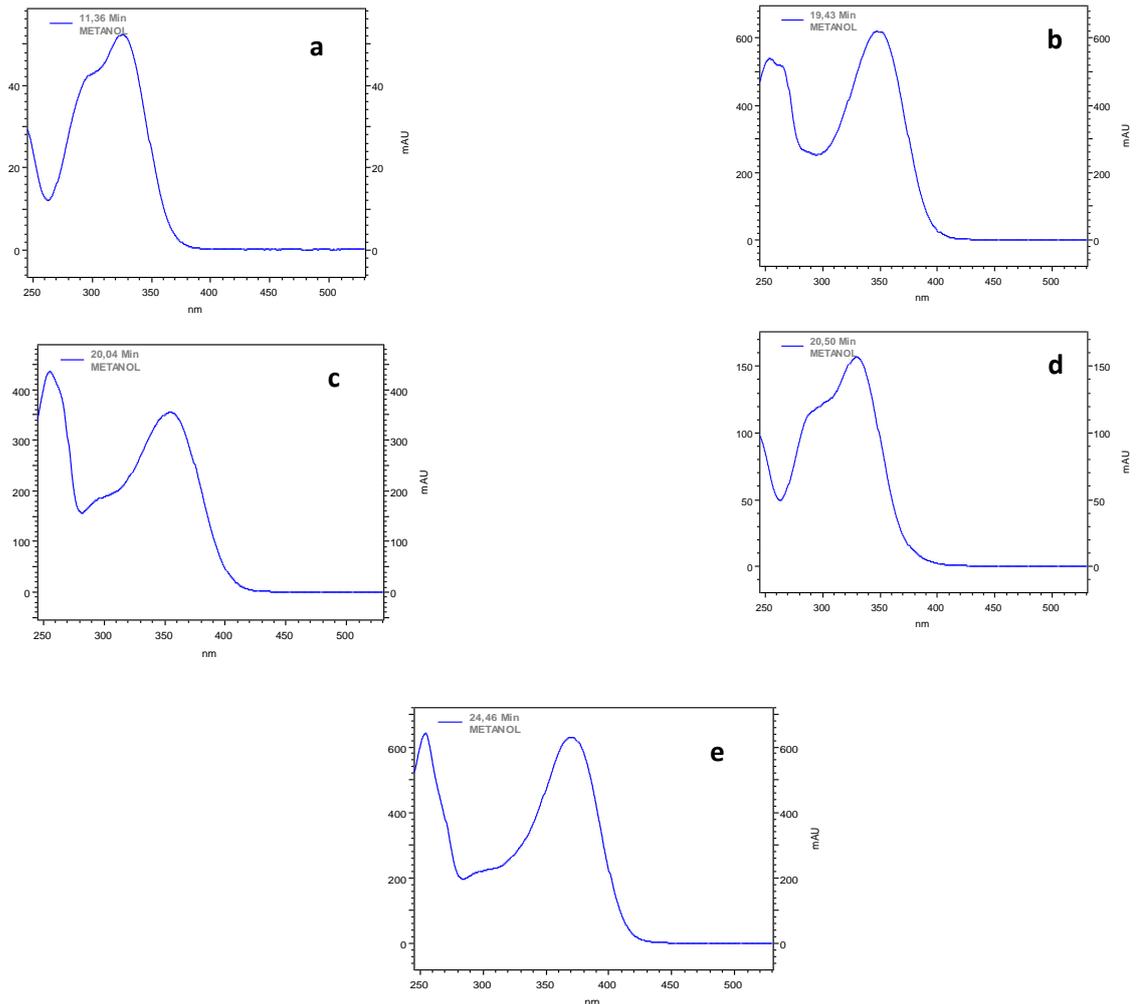


Figura 4.2 - Espectros visíveis dos compostos fenólicos padrões obtidos por HPLC-DAD a 350nm. (a) ácido clorogênico – máx. absorção 324nm; (b) luteolina – máx. absorção 348nm; (c) isoquercetina – máx. absorção 354nm e (d) ácido rosmarínico – máx. absorção 329nm (e) quercetina - - máx. absorção 370 nm

Foi detectada a presença de compostos pertencentes a duas classes principais de compostos fenólicos: ácidos hidroxicinâmicos e flavonóides, como podem ser observados nas tabelas 4.1 a 4.3. Os resultados estão de acordo com a literatura que afirma que os ácidos fenólicos e flavonoides são importantes antioxidantes naturais, encontrados em plantas medicinais da família Lamiaceae (Sytar *et al.*, 2018; Ávila-Reyes *et al.*, 2018). Estes compostos fenólicos desempenham papéis importantes no crescimento e desenvolvimento das plantas, particularmente nos mecanismos de defesa contra ataques de patógenos e insetos, radiação UV e ferimentos (Kulbat, 2016; Sytar *et al.*, 2018). Além disso, ácidos fenólicos e flavonóides vem sendo utilizados a favor da saúde humana na luta contra o câncer e outras doenças (Abotaleb *et al.*, 2019).

Planta	Número do Pico	Composto	Tempo de retenção	Área	Quantificação em µg/ml
<i>Hyptis marrubioides</i> "in vivo"	1	Derivados do ácido cafeoilquínico	10,960	635417	16,65
	2		12,193	1117479	
	3	Flavonas derivadas de luteolina	14,88	6658865	230,39
	4	Flavonóis derivados de quercetina	19,92	12960397	76,26
	5	Derivados de ácido rosmarínico	20,36	31293942	
	6		22,20	18677323	2.813,11
Teor total de fenólicos				3.136,41	
<i>Hyptis marrubioides</i> "in vitro"	1	Derivados do ácido cafeoilquínico.	12,213	2188318	20,79
	2	Flavonas derivadas de luteolina	14,840	7663123	
	3		16,507	3526292	442,43
	4		16,960	1598492	
	5	Derivados de ácido rosmarínico	20,347	13523129	
	6		20,727	1908288	868,82
Teor total de fenólicos				1.332,04	

Tabela 4.1 – Dados obtidos por HPLC-DAD do fitoconstituintes presentes em extratos metanólicos de folhas de Hm *in vivo* e *in vitro*.

Planta	Número do Pico	Composto	Tempo de retenção	Área	Quantificação em µg/ml
<i>Hyptis pectinata</i> "in vivo"	1	Derivados do ácido cafeoilquínico.	10,907	1240154	23,08
	2		12,173	1189886	
	3	Flavonóis derivados de quercetina	19,92	5269352	38,15
	5		21,84	1215952	
	4	Derivados de ácido rosmarínico	20,347	37602385	
	6		22,193	5703179	2.437,88
Teor total de fenólicos				2.499,11	
<i>Hyptis pectinata</i> "in vitro"	1	Derivados do ácido cafeoilquínico.	12,260	2303755	21,88
	2	Derivados de ácido rosmarínico	20,373	2508471	425,14
	3		26,087	4654920	
Teor total de fenólicos				447,02	

Tabela 4.2 – Dados obtidos por HPLC-DAD do fitoconstituintes presentes em extratos metanólicos de folhas de Hp *in vivo* e *in vitro*.

Planta	Número do Pico	Composto	Tempo de retenção	Área	Quantificação em µg/ml
<i>Hyptis suaveolens</i> "in vivo"	1	Derivados do ácido cafeoilquínico.	12,180	670118	37,56
	2		16,867	3283392	
	3	Flavonóis derivados de quercetina	19,93	3731051	21,95
	4	Derivados de ácido rosmarínico	20,367	12391832	1.071,17
	5		21,83	1234384	
	6		22,20	6507211	
Teor total de fenólicos				1.130,68	
<i>Hyptis suaveolens</i> "in vitro"	1	Derivados do ácido cafeoilquínico	12,22	3719409	35,33
	2	Flavonas derivadas de luteolina	14,753	4416450	14,75
	3	Derivados de ácido rosmarínico	20,347	56950933	3.663,48
	4		22,213	8125857	
Teor total de fenólicos				3.713,56	

Tabela 4.3 – Dados obtidos por HPLC-DAD do fitoconstituintes presentes em extratos metanólicos de folhas de Hp *in vivo* e *in vitro*.

Entre os ácidos hidroxicinâmicos verificamos a presença de derivados do ácido rosmarínico e derivados cafeoilquínico em todas as amostras. Quanto aos flavonóides, nas amostras *in vivo*, verificamos a presença de flavonas derivadas da luteolina e flavonóis derivados da quercetina, enquanto que nas amostras *in vitro* detectou-se a presença de flavonas derivadas da luteolina, com exceção do ExMtHpVt.

Com base nos resultados verificamos que o conteúdo fitoquímico das plantas cultivadas *in vivo* foi comparativamente maior do que o das plântulas cultivadas *in vitro*, salvo em Hs em que ocorreu o contrário. Mohan e colaboradores (2011) ao estudarem plantas cultivadas *in vivo* e calos cultivados *in vitro* de *Bacopa monnieri* afirmaram que a quantidade de fitoquímicos é relativamente maior nas amostras *in vivo*. Contudo, Collins (2001) relata que em muitos casos, culturas diferenciadas tendem a acumular metabólitos secundários em quantidades superiores às plantas-mãe. Tal situação aconteceu para o ácido rosmarínico em culturas de células, conforme descreve Matkowski (2008).

O ExMtHsVt apresentou um teor de compostos fenólicos totais de 3.713,56 ug/ml, resultado superior aos demais extratos, seguido de ExMtHmVv (3.136,41 ug/ml) e ExMtHpVv (2.499,11 ug/ml). O ácido rosmarínico foi o composto mais abundante em todas as amostras chegando a 3.663,48 ug/ml em ExMtHsVt. Além deste, a luteolina, também se destacou nas amostras de ExMtHmVv e ExMtHmVt com valores de 230,39 e 442,43 ug/ml, respectivamente. O ácido cafeoilquínico se fez presente em todos os extratos. A presença de quercetina foi confirmada nos ExMtHmVv, ExMtHpVv e ExMtHsVv. Conforme os resultados, os ácidos fenólicos são os mesmos para a espécie cultivada *in vivo* e sua correspondente, cultivada *in vitro* com diferenças no teor.

A triagem fitoquímica dos extratos metanólicos de *Hyptis* via HPLC-MS confirmou a presença de ácido rosmarínico (tabela 4.4 e figuras 4.3 e 4.4) em amostras *in vivo* e *in vitro*, estando de acordo com os resultados obtidos por HPLC-DAD.

Composto	Espécie	Íon precursor [M-H] (m/z)	Tr (min)
Ácido rosmarínico	ExMtHmVv	359.4	11.03
	ExMtHpVv	359.4	10.99
	ExMtHsVv	359.4	10.68
	ExMtHmVt	359.4	10.72
	ExMtHpVt	359.4	10.75
	ExMtHsVt	359.4	10.74

Tabela 4.4 - Dados de MS obtidos por HPLC-DAD-MS do AR identificado nos extratos metanólicos das folhas de Hm, Hp e Hs *in vivo* e *in vitro*. (Tr) tempo de retenção.

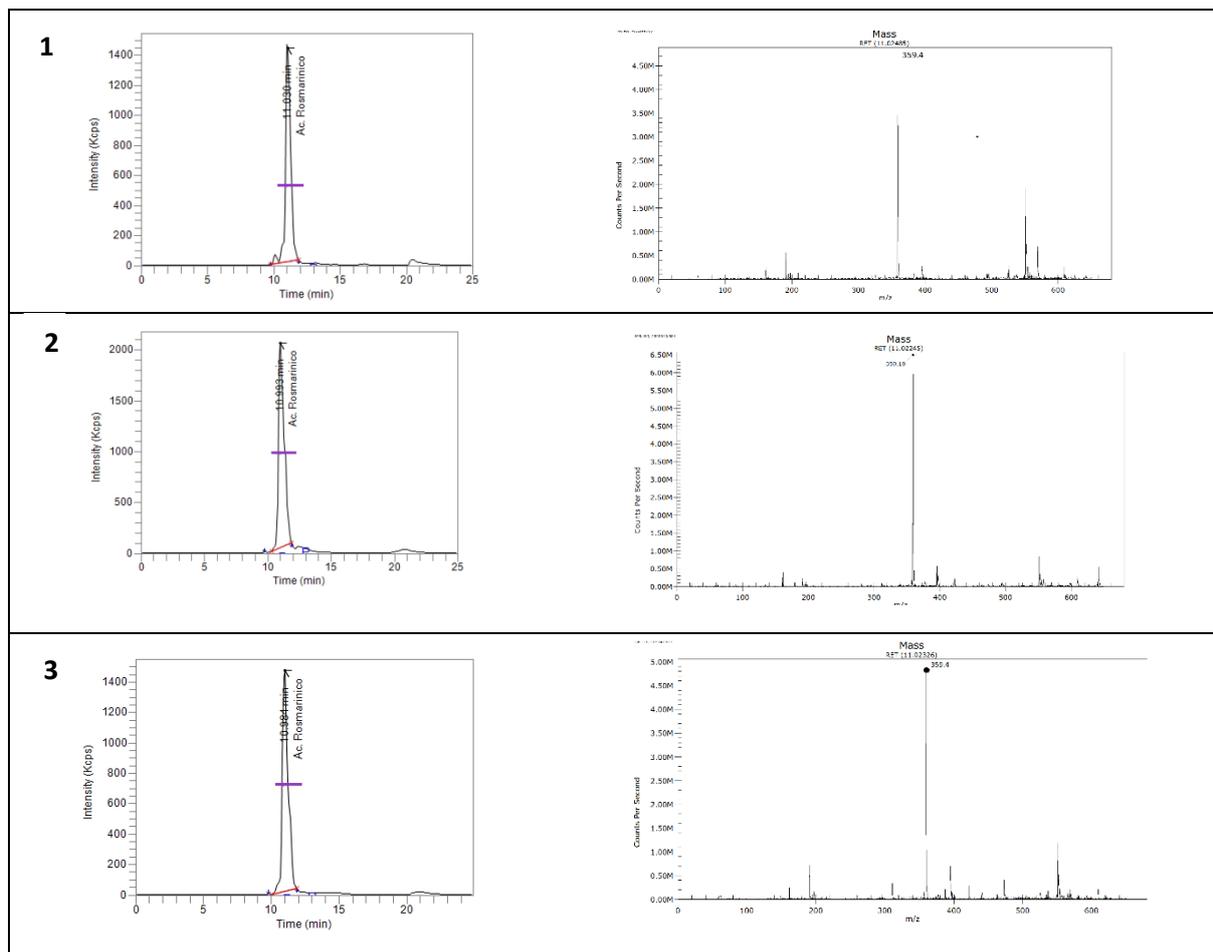


Figura 4.3 – Cromatogramas e espectros de massas de extratos metanólicos das folhas de Hm (1), Hp (2) e Hs (3) *in vivo* utilizados em análise por HPLC/MS. O composto identificado foi o ácido rosmarínico.

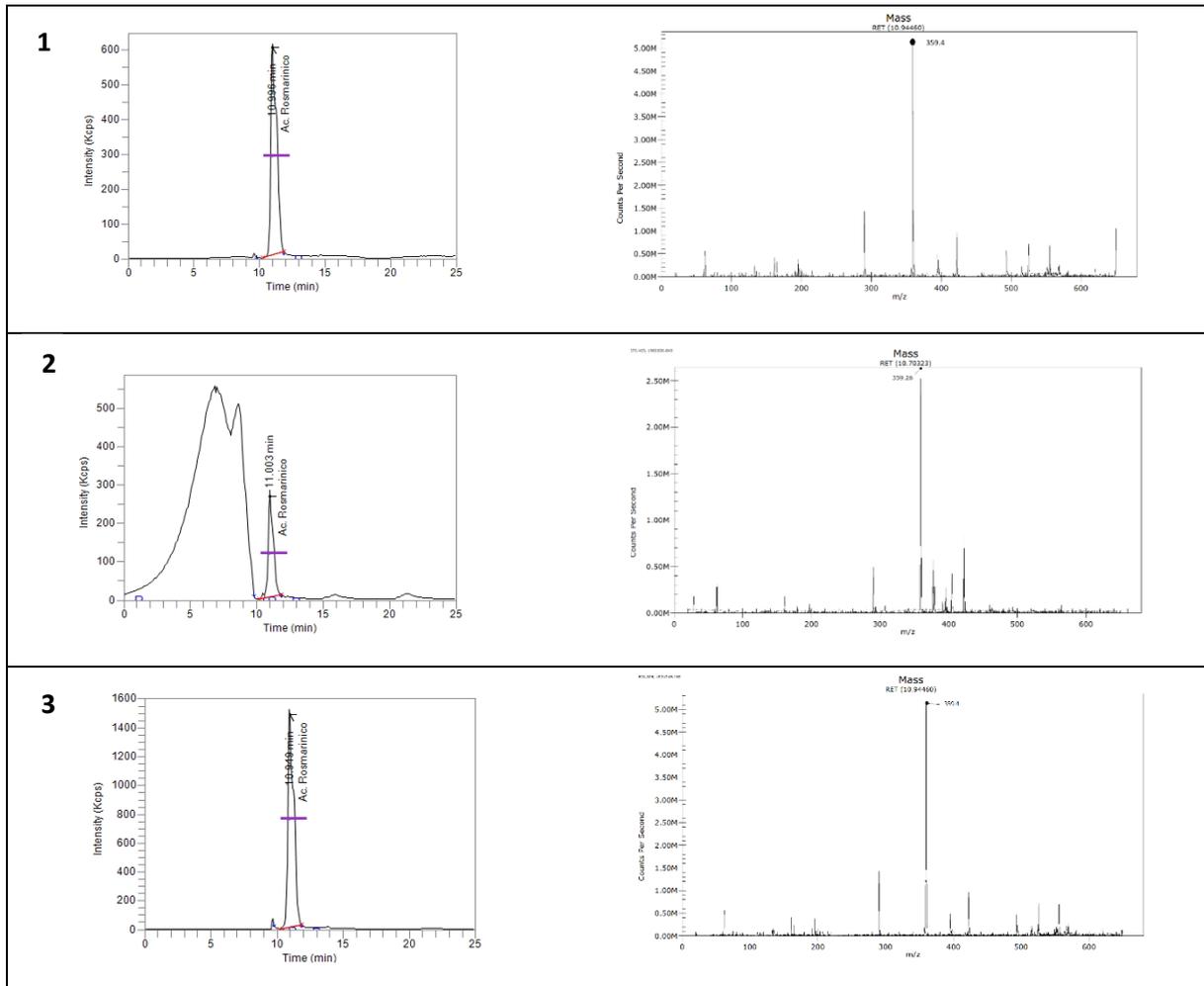


Figura 4.4 – Cromatogramas e espectros de massas de extratos metanólicos das folhas de Hm (1), Hp (2) e Hs (3) *in vitro* utilizados em análise por HPLC/MS. O composto identificado foi o ácido rosmarínico.

A presença de ácido rosmarínico e flavonóides já foi descrito anteriormente em espécie *Hyptis* por Falcão e colaboradores (2013). O AR é um éster de ácido cafeico que por ser comumente encontrado em espécies do gênero *Hyptis* (Falcão et al., 2016) pode caracterizar-se como um quimiomarcador específico deste gênero. Ele foi identificado como principal componente da espécie *H. pectinata* (Falcão et al., 2016; Pedroso et al., 2019b), *H. verticilata* (Kuhnt et al., 1994; Kuhnt et al., 1995) e *H. atrorubens* (Abedini et al., 2013). A presença do flavonol rutina foi observada por Pedroso e colaboradores (2017; 2019a) em plântulas *in vitro* de Hm eliciadas por ácido salicílico ou nitrato de prata ou luz branca ou azul.

Visto que investigações quanto ao perfil fitoquímico de plantas *Hyptis* spp. são escassos e a maioria têm se baseado na composição do óleo essencial, os resultados alcançados neste estudo irão contribuir com o avanço de pesquisas sobre este gênero.

4.4.2 Ensaio DPPH

O método do radical livre DPPH é um ensaio antioxidante baseado na transferência de elétrons que produz uma solução violeta em etanol (Garcia *et al.*, 2012). A presença de compostos antioxidantes no meio provoca a redução do radical DPPH ao doarem um átomo de hidrogênio ou um elétron e acarreta mudança de cor violeta para amarelo que pode ser monitorada por espectrofotômetro (Akar *et al.*, 2017). Este método é um dos mais utilizados pela sua praticidade, rapidez, alta sensibilidade, precisão, economia, e por ser um radical estável (Espín *et al.*, 2000; Kedare e Singh, 2011; Chen *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2011). Todavia, a inexistência de DPPH· ou radicais livres mais reativos semelhantes em sistemas biológicos é uma deficiência que torna a metodologia fisiologicamente desinteressante (Bologon *et al.*, 2014). Outro dilema quanto ao método pode ser verificado na literatura, onde modificações e, conseqüentemente, diferentes protocolos são aplicados. Assim, diversas maneiras de interpretar e determinar a capacidade antioxidante tornam incoerentes comparações de resultados entre protocolos diferenciados reforçando a necessidade padronização do método DPPH (Oliveira, 2015)

Neste ensaio verificou-se que o radical DPPH estável de coloração violeta sofreu uma reação de oxirredução e foi reduzido a hidrazina (DPPH-H) de coloração amarela por ação antioxidante dos extratos de *Hyptis* (figura 4.5).

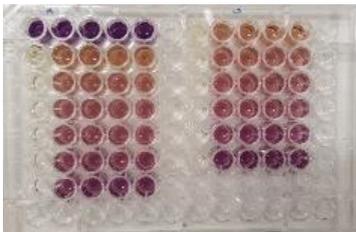


Figura 4.5 – Microplaca demonstrativa do ensaio DPPH ao final de 60 minutos. Fonte: Elaborada pela própria autora, Braga, Portugal, 2018.

A descoloração foi monitorada por espectrofotometria e os dados obtidos foram usados para traçar curvas referentes a porcentagem de redução do DPPH *versus* concentração dos extratos (figura 4.6).

A partir das curvas, determinou-se a concentração de extrato efetiva capaz de induzir a redução de 50% do DPPH inicial da reação até sua estabilidade, EC_{50} (figura 4.7 e tabela 4.5). Quanto menor o valor do EC_{50} , maior a capacidade antioxidante dos extratos.

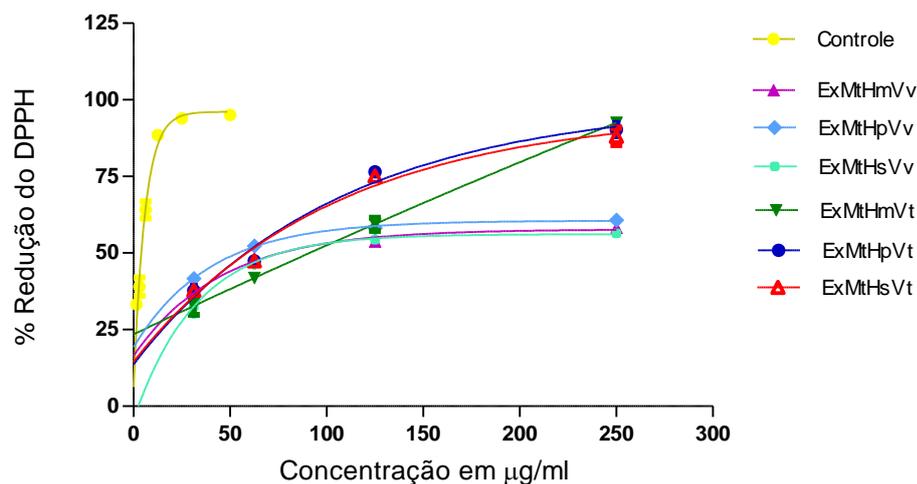


Figura 4.6 – Redução de radicais DPPH pela ação antioxidante da quercetina e dos extratos metanólicos de plantas “*in vivo*” de *Hyptis marruboides* (ExMtHmVv), *Hyptis pectinata* (ExMtHpVv) e *Hyptis suaveolens* (ExMtHsVv) e “*in vitro*” de *Hyptis marruboides* (ExMtHmVt), *Hyptis pectinata* (ExMtHpVt) e *Hyptis suaveolens* (ExMtHsVt). Os valores são provenientes de três experimentos triplicados independentes e representados com média \pm E.P.M.

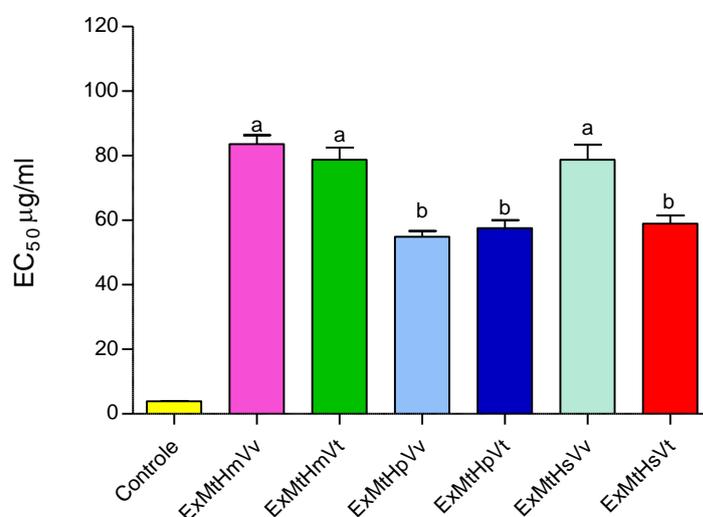


Figura 4.7 – EC₅₀ do padrão quercetina e dos extratos metanólicos de plantas “*in vivo*” de *Hyptis marruboides* (ExMtHmVv), *Hyptis pectinata* (ExMtHpVv) e *Hyptis suaveolens* (ExMtHsVv) e “*in vitro*” de *Hyptis marruboides* (ExMtHmVt), *Hyptis pectinata* (ExMtHpVt) e *Hyptis suaveolens* (ExMtHsVt). Cada coluna representa a média \pm E.P.M. considerando os resultados obtidos a partir de três experimentos independentes. As amostras foram comparadas entre si, duas a duas. Todos os valores são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,005$), exceto aqueles marcados com a mesma letra.

Extratos	EC ₅₀ (µg/ml)
Quercetina	3,910 \pm 0,07
<i>Hyptis marruboides in vivo</i> (ExMtHmVv)	83,57 \pm 2,80
<i>Hyptis marruboides in vitro</i> (ExMtHmVt)	78,77 \pm 3,80
<i>Hyptis pectinata in vivo</i> (ExMtHpVv)	54,87 \pm 1,80
<i>Hyptis pectinata in vitro</i> (ExMtHpVt)	57,53 \pm 2,51
<i>Hyptis suaveolens in vivo</i> (ExMtHsVv)	78,77 \pm 4,61
<i>Hyptis suaveolens in vitro</i> (ExMtHsVt)	59,00 \pm 2,54

Tabela 4.5 – Valores EC₅₀ dos extratos metanólicos de *Hyptis* no ensaio DPPH. Os dados representam médias \pm E.P.M. para três experimentos diferentes.

O valor EC_{50} da quercetina é significativamente menor que os dos extratos das *Hyptis* ($p \leq 0,005$), o que indica maior capacidade antioxidante do padrão. Contudo, verifica-se que todos os extratos de *Hyptis* apresentam EC_{50} e, portanto, uma possível ação antioxidante, o que pode ser justificado pela presença de compostos fenólicos. Conforme Jiang e Zhang (2012) os compostos fenólicos podem atuar como antioxidantes pela capacidade de eliminar o excesso de radicais livres e manter o equilíbrio de EROs no corpo humano.

Dos seis extratos analisados, destacam-se o ExMtHpVv, ExMtHpVt e ExMtHsVt com maior propriedade anti-radicalar, $EC_{50}=54,87 \mu\text{g/ml}$, $EC_{50}=57,53 \mu\text{g/ml}$ e $EC_{50}=59 \mu\text{g/ml}$, respectivamente. Nos ensaios fitoquímicos, verificou-se que o ExMtHpVv foi o que apresentou a maior quantidade de compostos fenólicos entre as espécies *in vivo* enquanto que o ExMtHsVt apresentou a maior quantidade entre as *in vitro*. O ExMtHmVv não demonstrou média significativamente diferente do ExMtHmVt, assim como, o do ExMtHpVv e ExMtHpVt, quando comparados pelo teste t. Já o resultado do ExMtHsVv quando confrontado com o ExMtHsVt, apresentou médias significativamente diferentes, sendo que a amostra *in vitro* apresentou maior capacidade antioxidante com $EC_{50}=59,00 \mu\text{g/ml}$ e maior teor de compostos fenólicos. Correlação positiva entre a atividade antioxidante de extratos metanólicos de Hs e a presença de fenólicos foi confirmada nos estudos de Ghaffari e colaboradores (2014) e Gavani e Paarakh (2008).

Outros estudos destacam a ação antioxidante e a presença de fenólicos em plantas *Hyptis*. Segundo Rebelo e colaboradores (2009), os extratos metanólicos de *H. crenata* apresentaram EC_{50} de $16,7 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$ comparável ao do antioxidante BHT ($19,8 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$) demonstrando significativa atividade antioxidante atribuída à presença de compostos fenólicos polares. Já o extrato etanólico de *H. fasciculata* ($EC_{50}= 35 \mu\text{g/ml}$) mostrou maior capacidade de eliminar o radical livre DPPH do que o extrato etanólico de *Ginco biloba* ($EC_{50}= 41,5 \mu\text{g/ml}$) usado como padrão devido em parte, à presença de substâncias fenólicas (Silva *et al.*, 2005; 2009). Outro estudo relata que a presença de flavonoides, saponinas, taninos e xantonas em extratos etanólicos de *H. fruticosa* podem estar ligados à sua atividade antioxidante (Andrade *et al.*, 2010).

Com base nos resultados é possível inferir que os extratos vegetais de *Hyptis* foram capazes de reduzir a molécula de DPPH e que essa capacidade pode estar relacionada à presença de ácido rosmarínico e outros compostos fenólicos.

4.4.3 Ensaio da capacidade de quelação do ferro

A interrupção da homeostase celular pela ação catalítica de alguns metais, como o ferro, vem sendo progressivamente confirmada pela literatura. O ferro é um elemento fundamental para o transporte de oxigênio, síntese de DNA e metabolismo energético cuja carência acarreta desordens em todo o organismo (Grotto, 2008). Contudo, é preciso ressaltar que o ferro e outros metais de transição (cobre, cromo, cobalto, vanádio, cádmio, arsênio, níquel) podem doar ou aceitar elétrons livres durante reações intracelulares, catalisando a formação de EROs os quais lesam proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucléicos dentro das células (Končić *et al.*, 2011).

Em situações de estresse oxidativo, o excesso de ânions superóxido (O_2^-) reage com os íons Fe^{3+} reduzindo-os a íons Fe^{2+} que podem participar da reação Fenton e reagir com o peróxido de hidrogênio (Harb *et al.*, 2016). Os íons Fe^{2+} convertem H_2O_2 em hidroxilas ($OH\cdot$) altamente reativas caracterizando-se como potentes pró-oxidantes (Vanconcelos *et al.*, 2007). A quelação de metais por certos compostos antioxidantes é capaz de diminuir o efeito pró-oxidante do metal reduzindo seu potencial redox e estabilizando a sua forma oxidada, bem como impedindo estericamente a formação do complexo hidroperóxido metálico (Končić *et al.*, 2011). Assim, faz-se relevante a busca por fontes naturais de antioxidantes com ação quelante em metais pró-oxidantes no intuito de evitar danos aos tecidos e, assim, garantir a manutenção das funções celulares essenciais.

O ensaio ICA faz uso de uma metodologia simples para avaliar o potencial de uma amostra de reduzir a peroxidação lipídica ou a formação de radicais livres resultantes das reações de Fenton e Haber-Weiss (Harb *et al.*, 2016). Nos ensaios com as *Hyptis*, a reação da capacidade de quelação do ferro foi facilmente visualizada na microplaca, conforme a figura 4.8.

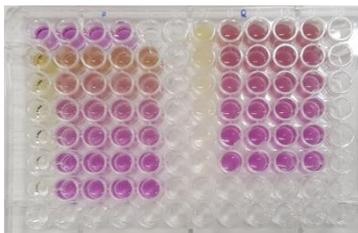


Figura 4.8 – Microplaca demonstrativa do ensaio da capacidade de quelação do ferro. Fonte: Elaborada pela própria autora, Braga, Portugal, 2018.

Os dados obtidos após leitura das microplacas no espectrofotômetro foram usados para traçar as curvas referentes a porcentagem de quelação do ferro *versus* concentração dos extratos de *Hyptis* (figura 4.9).

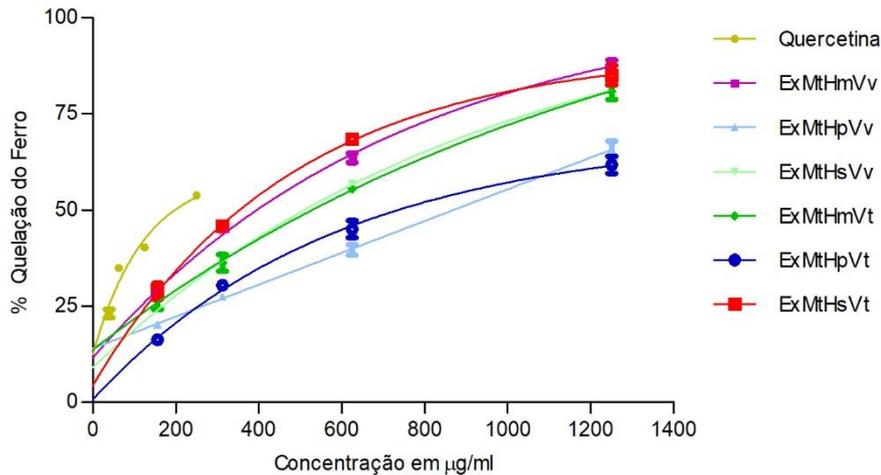


Figura 4.9 – Atividade de quelação do íon ferro pela ação quelante da quercetina e dos extratos metanólicos de plantas “*in vivo*” de *Hyptis marrubioides* (ExMtHmVv), *Hyptis pectinata* (ExMtHpVv) e *Hyptis suaveolens* (ExMtHsVv) e “*in vitro*” de *Hyptis marrubioides* (ExMtHmVt), *Hyptis pectinata* (ExMtHpVt) e *Hyptis suaveolens* (ExMtHsVt). Os valores são provenientes de três experimentos triplicados independentes e representados com média ± E.P.M.

A partir das curvas, descobriu-se a concentração de extrato efetiva (EC₅₀) para quelar 50% dos íons Fe²⁺ disponíveis, interrompendo a formação do complexo Fe(II)(Fz)₃ (figura 4.10 e tabela 4.6).

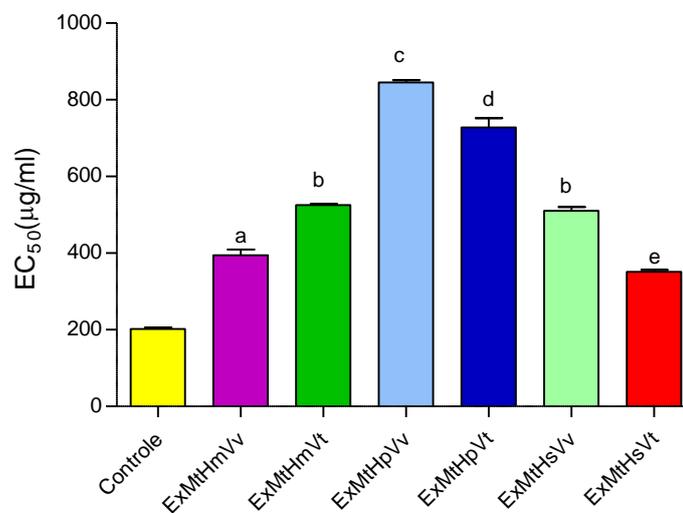


Figura 4.10 – EC₅₀ do padrão quercetina e dos extratos metanólicos de plantas “*in vivo*” de *Hyptis marrubioides* (ExMtHmVv), *H. pectinata* (ExMtHpVv) e *H. suaveolens* (ExMtHsVv) e “*in vitro*” de *H. marrubioides* (ExMtHmVt), *H. pectinata* (ExMtHpVt) e *H. suaveolens* (ExMtHsVt). Cada barra representa a média ± E.P.M. considerando os resultados obtidos a partir de três experimentos independentes. As amostras foram comparadas entre si, duas a duas. Todos os valores são estatisticamente diferentes (p≤0,005), exceto aqueles marcados com a mesma letra.

Antioxidantes	EC ₅₀ (µg/ml)
Quercetina	202.3 ± 2.963
<i>Hyptis marruboides in vivo</i> (ExMtHmVv)	394.7 ± 14.530
<i>Hyptis marruboides in vitro</i> (ExMtHmVt)	525.0 ± 4.163
<i>Hyptis pectinata in vivo</i> (ExMtHpVv)	845.7 ± 5.207
<i>Hyptis pectinata in vitro</i> (ExMtHpVt)	728.0 ± 24.27
<i>Hyptis suaveolens in vivo</i> (ExMtHsVv)	510.3 ± 10.11
<i>Hyptis suaveolens in vitro</i> (ExMtHsVt)	351.3 ± 4.807

Tabela 4.6 – Valores EC₅₀ dos extratos metanólicos de *Hyptis* no ensaio quelação do ferro. Os dados representam médias ± E.P.M. para três experimentos diferentes.

O valor EC₅₀ da quercetina foi significativamente menor que os dos extratos das *Hyptis* ($p \leq 0,005$), o que indica maior capacidade antioxidante do padrão. Todos os extratos interferiram na formação de complexo Fe(II)(Fz)₃. Contudo, os ExMtHsVt seguido de ExMtHmVv foram os extratos que mais se destacaram na quelação do ferro (EC₅₀ = 351,3 µg/ml e EC₅₀ = 394,7 µg/ml) e, curiosamente, foram aqueles que apresentaram maior teor de fenólicos totais para amostras *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. Os compostos fenólicos presentes nos extratos de *Hyptis* podem exercer o seu efeito antioxidante como agentes queladores de metal reduzindo a atividade pro-oxidante destes últimos (Silva *et al.*, 2014b). Esses resultados corroboram com os de Benabdallah e colaboradores (2016) que relatam que extratos metanólicos de espécies de *Mentha* mostraram níveis antioxidantes consideráveis correlacionados ao forte teor de polifenóis. Esta correlação está associada a presença de grupos hidroxilo e carboxilo, capazes de se ligarem ao ferro e inativarem estes íons por quelação suprimindo a reação de Fenton, com formação de O₂^{•-}, considerada a fonte mais importante de EROS (Arora *et al.*, 1998; Michalak, 2006).

A presença do ácido rosmarínico como composto majoritário em todos os extratos de *Hyptis* pode ser um dos motivos das propriedades quelantes obtidas nos ensaios, o que está de acordo com os resultados relatados por Mekinic e colaboradores (2014). Segundo eles, o extrato de erva-cidreira (*Melissa officinalis* L.) apresentou um valor EC₅₀ significativo para quelação do ferro que pode ser justificado pelo abundante teor de ácido rosmarínico cuja a presença de dois grupos orto-dihidroxi (estruturas catecóis) é extremamente importante para uma forte atividade quelante.

4.4.4 Ensaio da capacidade de inibição da produção de óxido nítrico

O radical de óxido nítrico (NO[•]) tem um papel fundamental na regulação de diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos (Pacher *et al.*, 2007). É considerado uma “faca de dois gumes” (*double-edged sword*) por apresentar a capacidade de ser benéfico ou potencialmente tóxico conforme a

concentração e o tecido em questão, bem como da capacidade de depuração tecidual (Schmidt e Walter, 1994; Flora Filho e Zilberstein, 2000).

O envolvimento do NO nos processos fisiológicos de mamíferos se refere a neurotransmissão, controle da pressão sanguínea, inflamação, reações imunológicas e nos mecanismos de defesa contra microorganismos e tumores (Costa *et al.*, 2003). Todavia, o descontrole com altas concentrações de NO pode ocasionar sua reação com o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) formando o oxidante peroxinitrito (ONOO) com efeitos potencialmente danosos ao aumentar o estresse oxidativo, induzir a peroxidação lipídica, desestabilizar membranas, oxidar e nitrar proteínas e danificar o DNA (Pacher *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2010). Entre as fisiopatologias associadas ao descontrole de NO, destacamos as doenças cardiovasculares, autoimunidade, rejeição de transplantes, doenças degenerativas como sépsis, genotoxicidade, surgimento de neoplasias e carcinogênese (Costa *et al.*, 2003).

Na intenção de frear a ocorrência de processos de toxicidade induzida por espécies reativas, antioxidantes naturais que sequestram o radical óxido nítrico aguçam a pesquisa por compostos bioativos de extratos vegetais como uma alternativa terapêutica com importante papel citoprotetor, de modulação de processos inflamatórios e de diminuição do estresse oxidativo (Saha e Pahan, 2006a, 2006b). Portanto, o ensaio da capacidade de inibição da produção de NO desenvolvido neste estudo veio de encontro com esse anseio. O teste foi escolhido por ser considerado um método oficial para determinação de nitrito envolvendo procedimentos espectrofotométricos baseados na reação de Griess (Ramos *et al.*, 2006).

A reação da capacidade de inibição da formação de óxido nítrico foi facilmente visualizada na microplaca, conforme a figura 4.11.

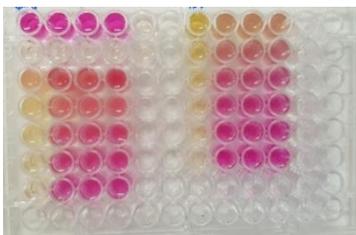


Figura 4.11 - Microplaca demonstrativa do ensaio de inibição da formação de óxido nítrico. Fonte: Elaborada pela própria autora, Braga, Portugal, 2018.

Os resultados oriundos da leitura espectrofotométrica foram usados para traçar as curvas referentes a % de redução do NO *versus* as concentrações para cada amostra independente (figura 4.12).

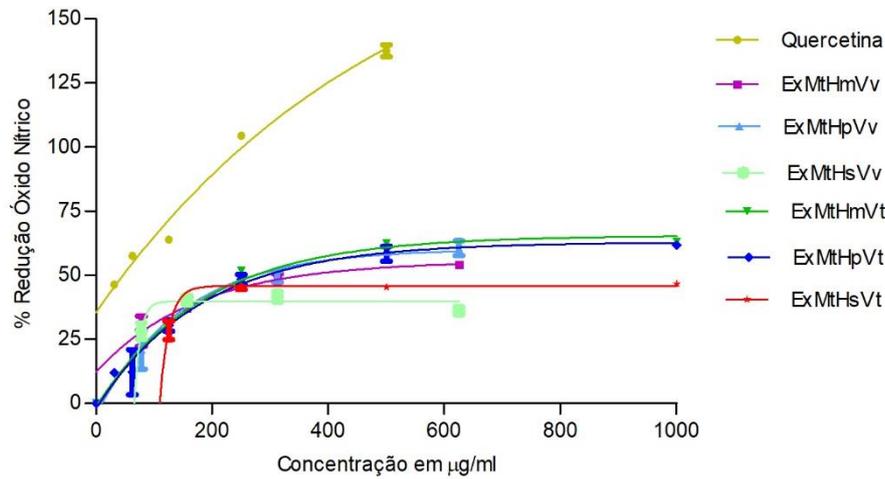


Figura 4.12 – Redução da produção de óxido nítrico pela quercetina e pelos extratos metanólicos de plantas “*in vivo*” de *Hyptis marruboides* (ExMtHmVv), *Hyptis pectinata* (ExMtHpVv) e *Hyptis suaveolens* (ExMtHsVv) e “*in vitro*” de *Hyptis marruboides* (ExMtHmVt), *Hyptis pectinata* (ExMtHpVt) e *Hyptis suaveolens* (ExMtHsVt). Os valores são provenientes de três experimentos triplicados independentes e representados com média \pm E.P.M.

A partir das curvas determinou-se a capacidade antioxidante para quercetina e todos os extratos de *Hyptis* de reduzir em 50% a presença de óxido nítrico gerado a partir do nitroprussiato de sódio, o EC_{50} , representado na figura 4.13 e tabela 4.7).

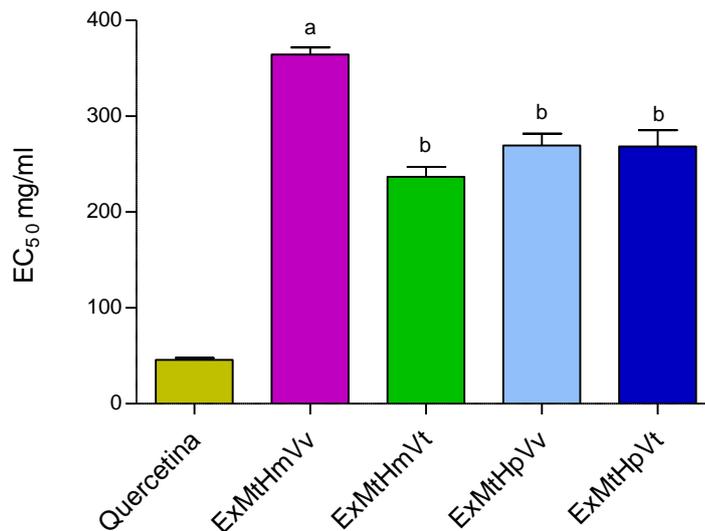


Figura 4.13 – EC_{50} do padrão quercetina e dos extratos metanólicos de plantas “*in vivo*” de *Hyptis marruboides* (ExMtHmVv) e *Hyptis pectinata* (ExMtHpVv) e “*in vitro*” de *Hyptis marruboides* (ExMtHmVt), *Hyptis pectinata* (ExMtHpVt). Cada coluna representa a média \pm E.P.M. considerando os resultados obtidos a partir de três experimentos independentes. As amostras foram comparadas entre si pelo teste t. Todos os valores são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,005$), exceto aqueles marcados com a mesma letra. Para os extratos de *Hyptis suaveolens in vivo* e *in vitro* o EC_{50} não foi atingido.

Antioxidantes	EC ₅₀ (µg/ml)
Quercetina	45.67 ± 2.275
<i>Hyptis marruboides in vivo</i> (ExMtHmVv)	364.3 ± 7.535
<i>Hyptis marruboides in vitro</i> (ExMtHmVt)	236.7 ± 10.37
<i>Hyptis pectinata in vivo</i> (ExMtHpVv)	269.3 ± 12.33
<i>Hyptis pectinata in vitro</i> (ExMtHpVt)	268.3 ± 17.13

Tabela 4.7 – Resultados da análise de quelação do óxido nítrico. Os dados representam médias ± E.P.M. para três experimentos diferentes. Para os extratos de *Hyptis suaveolens* “*in vivo*” e “*in vitro*” o EC₅₀ não foi atingido.

O valor EC₅₀ da quercetina foi significativamente menor que os dos extratos das *Hyptis* ($p \leq 0,005$), o que indica maior capacidade antioxidante do padrão. ExMtHmVt, ExMtHpVt, ExMtHpVv e ExMtHmVv reduziram a produção de óxido nítrico, sugerindo que eles possuam capacidade antioxidante.

Observando a tabela 4.7, verifica-se que o EC₅₀ para o ExMtHpVv (EC₅₀=269,3 µg/ml) não demonstrou média significativamente diferente do ExMtHpVt (EC₅₀=268,3 µg/ml). Já o resultado do ExMtHmVv (EC₅₀=364,3 µg/ml) quando confrontado com o ExMtHmVt (EC₅₀=236 µg/ml), apresentou médias significativamente diferentes, sendo que a amostra *in vitro* apresentou maior potencial antioxidante. Não foi possível determinar o EC₅₀ para ExMtHsVv e ExMtHsVt, nas concentrações testadas. Este é o primeiro trabalho quanto a aplicação dessa metodologia para extratos de espécies do gênero *Hyptis*. Todavia, Serafini e colaboradores (2017), já indicavam o potencial do composto calamusenona isolada do óleo essencial de *H. pectinata* nas concentrações de 100 µg/ml e 1 mg/ml como agente sequestrador de NO.

Estudos referentes a espécies das Lamiaceae confirmam o potencial desta família como sequestrador de NO. O extrato metanólico de *Ocimum gratissimum* L., por exemplo, a 250 µg/ml conseguiu reduzir em 50% a concentração de NO (Awah e Verla, 2010). *Plectranthus mollis* e *Salvia officinalis* também mostraram redução significativa do NO com valores de EC₅₀=37,44 µg/ml e EC₅₀=22,71 µg/ml, respectivamente, que segundo Ramu e Dhanabal (2015) pode estar associada aos constituintes químicos presentes na planta. Em outro estudo, Annapandian e Rajagopal (2017), relataram que o extrato etanólico e o extrato de éter de petróleo de *Leucas aspera* apresentaram relevante atividade de sequestro de NO com EC₅₀= 11,87 µg/ml e EC₅₀=13,47 µg/ml. Franco e colaboradores (2018), afirmam que o mecanismo de redução de radicais NO pelos extratos vegetais envolve compostos fenólicos e que, portanto, o significativo valor EC₅₀ exibido por extratos aquosos de *Melissa officinalis* (35 ± 12 µg/ml) pode estar relacionado a existência de ácido rosmarínico e outros compostos fenólicos. Esses estudos estão de acordo com nossos resultados que citam o potencial dos extratos *Hyptis* no sequestro de NO e que podem ser um indicativo da capacidade anti-inflamatória podendo atuar na

modulação do processo inflamatório, diminuindo seus efeitos danosos ao organismo e auxiliando na manutenção da homeostase (Maia *et al.*, 2010).

4.4.5 Ensaio da capacidade de sequestro do ânion superóxido

Durante a respiração aeróbia, o oxigênio molecular é reduzido a água pela incorporação de quatro elétrons resultantes da cadeia respiratória. Todavia, sob determinadas condições, pode haver redução do oxigênio com um elétron originando o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Turrens, 2003).

Outras fontes importantes de formação de $O_2^{\cdot-}$ são a enzima xantina oxidase, as enzimas oxidantes (aldeído oxidase, flavina desidrogenase, ciclooxigenase, NADPH oxidase e sistema citocromo P450 oxidase); auto-oxidação de pequenas moléculas (catecolaminas, flavinas e hidroquinonas); e sistema de carregadores de elétrons microsomais e das membranas nucleares, entre outras (Delbin *et al.*, 2009).

O $O_2^{\cdot-}$ não é um oxidante forte, mas pode interagir com outras moléculas e formar outras espécies reativas de oxigênio tóxicas, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito (ONOO) e radicais hidroxilo ($HO\cdot$) (Ferreira e Abreu, 2007; Tao *et al.*, 2014). Estas EROs induzem danos oxidativos nos lipídios das membranas, nas proteínas e enzimas e no DNA (Pieta, 2000). Assim, compostos antioxidantes de plantas capazes de interceptar as EROs antes destas ocasionarem danos a célula, e, portanto, com capacidade de eliminar o ânion superóxido são o grande alvo de pesquisas científicas.

No método utilizado neste estudo para determinação da capacidade de interceptação do radical ânion superóxido, ocorreu uma reação não enzimática na qual o metassulfato de fenazina (PMS) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) produz o ânion superóxido. Em seguida, dois radicais superóxidos doam, cada um, um elétron para o azul de nitrotetrazólio (NBT) que é reduzido a formazana, um cromóforo azul que apresenta um máximo de absorção a 560nm (Ewing e Janero, 1995; Magalhães *et al.*, 2008).

Ao se adicionar algum extrato antioxidante neste meio, ele compete com o NBT pelo ânion radical superóxido. Nesse processo ocorre a diminuição da velocidade de redução do NBT e, conseqüentemente, de formazana com decréscimo da intensidade da cor, conforme figura 4.14 (Ewing e Janero, 1995; Magalhães *et al.*, 2008).

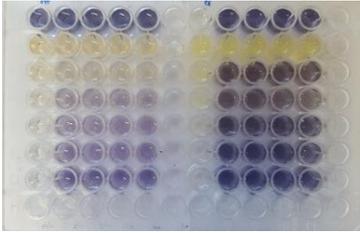


Figura 4.14. Microplaca demonstrativa do ensaio de avaliação do sequestro de superóxido. Fonte: Elaborada pela própria autora, Braga, Portugal, 2018.

Após leitura espectrofotométrica da placa, os resultados foram utilizados para traçar as curvas referentes a porcentagem de redução da produção de azul de nitrotetrazólio (% NBT) *versus* as concentrações de extratos para cada amostra independente (figura 4.15).

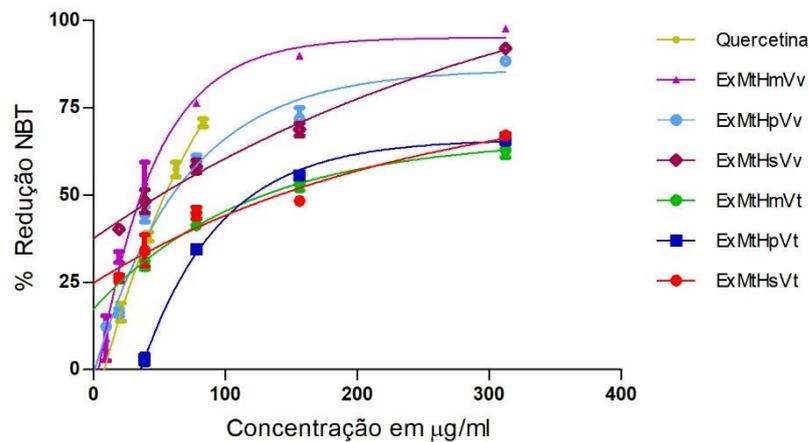


Figura 4.15 – Inibição da produção de azul de nitrotetrazólio pela quercetina e pelos extratos metanólicos de plantas “*in vivo*” de *Hyptis marrubioides* (ExMtHmVv), *Hyptis pectinata* (ExMtHpVv) e *Hyptis suaveolens* (ExMtHsVv) e “*in vitro*” de *Hyptis marrubioides* (ExMtHmVt), *Hyptis pectinata* (ExMtHpVt) e *Hyptis suaveolens* (ExMtHsVt). Os valores são provenientes de três experimentos triplicados independentes e representados com média \pm E.P.M..

A partir das curvas descobriu-se a capacidade antioxidante para todos os extratos de reduzirem em 50% a presença de NBT gerado a partir da reação PMS + NADH, ou seja, o EC_{50} , que foi representado na figura 4.16 e tabela 4.8.

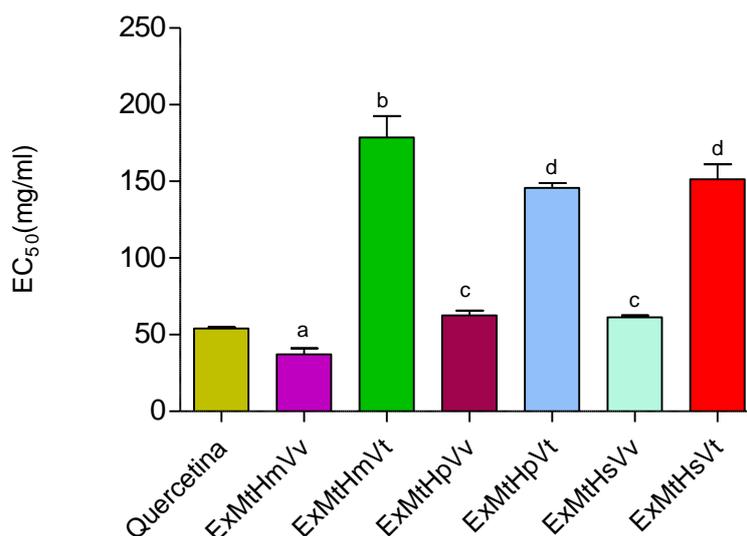


Figura 4.16 – EC₅₀ do padrão quercetina e dos extratos metanólicos de plantas “*in vivo*” de *Hyptis marruboides* (ExMtHmVv), *Hyptis pectinata* (ExMtHpVv) e *Hyptis suaveolens* (ExMtHsVv) e “*in vitro*” de *Hyptis marruboides* (ExMtHmVt), *Hyptis pectinata* (ExMtHpVt) e *Hyptis suaveolens* (ExMtHsVt). Cada coluna representa a média ± E.P.M. considerando os resultados obtidos a partir de três experimentos independentes. As amostras foram comparadas entre si pelo teste t. Todos os valores são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,005$), exceto aqueles marcados com a mesma letra.

Antioxidantes	EC ₅₀ (µg/ml)
Quercetina	54.10 ± 0.8185
<i>Hyptis marruboides in vivo</i> (ExMtHmVv)	37.17 ± 3.973
<i>Hyptis marruboides in vitro</i> (ExMtHmVt)	178.7 ± 13.84
<i>Hyptis pectinata in vivo</i> (ExMtHpVv)	62.50 ± 3.323
<i>Hyptis pectinata in vitro</i> (ExMtHpVt)	145.7 ± 3.180
<i>Hyptis suaveolens in vivo</i> (ExMtHsVv)	61.33 ± 1.178
<i>Hyptis suaveolens in vitro</i> (ExMtHsVt)	151,3 ± 9.838

Tabela 4.8 – Resultados da análise do sequestro do radical superóxido. Os dados representam médias ± E.P.M. para três experimentos diferentes.

O ExMtHmVv apresentou o melhor EC₅₀ = 37,17 µg/ml, até mesmo quando comparado com a quercetina com EC₅₀ = 54,10 µg/ml. Em seguida, destacou-se o ExMtHsVv com EC₅₀ = 61,33 µg/ml e o ExMtHpVv com EC₅₀ = 62,50 µg/ml. As amostras *in vitro* apesar de apresentarem inibição de NBT, obtiveram valores EC₅₀ mais altos que as amostras *in vivo* e, portanto, médias significativamente diferentes quando comparadas. Deepika e colaboradores (2013) destacaram boa atividade de sequestro de ânion superóxido para extrato de acetato de etila de *H. suaveolens*. Já para Hm e Hp não há relatos sobre o uso dessa metodologia, sendo este estudo o primeiro a constatar o potencial das duas espécies.

Outros estudos confirmam a capacidade de eliminação de radicais ânion superóxido de espécies pertencentes a família Lamiaceae. Jun e colaboradores (2001) relataram que o extrato de metanol da

manjerona (*Origanum majorana*) exibiu forte capacidade de eliminação de radicais ânion superóxido (85,5%). Thirugnanasampandan e Jayakumar (2011) demonstraram uma inibição significativa do superóxido pelos extratos etanólicos de folhas das plantas *Anisomelos malabarica*, *Leucas aspera* e *Ocimum basilicum* (Thirugnanasampandan e Jayakumar, 2011). Segundo esses autores, *O. basilicum* contém polifenóis e flavonóides mais elevados que *L. aspera* e *A. malabarica* e estes compostos fenólicos podem estar relacionados com sua atividade antioxidante. Nos trabalhos de Tanaka e colaboradores (2003) a atividade de eliminação de radicais de aniões superóxido pelos compostos fenólicos cresceu proporcionalmente ao número de hidroxilas fenólicas na molécula. Aherner e colaboradores (2007), afirmam que a ação antioxidante exibida por *Rosmarinus officinalis*, *Origanum vulgare* e *Salvia officinalis*, pode ser devida à presença de fenólicos

4.4.6 Ensaio de oxidação do β -caroteno/ácido linoleico

O β -caroteno é o mais abundante dos carotenoides encontrado em frutas e verduras e, por isso, muito utilizado na dieta alimentar humana. Também, tem sido muito procurado por suas propriedades antioxidantes *in vitro* e em modelos animais relacionadas ao seu potencial para eliminar o oxigênio singlete e capturar radicais de peróxido (Russell e Paiva, 1999).

Em produtos alimentícios, como bebidas, o β -caroteno é empregado como agente corante e sua descoloração representa redução da qualidade do produto (Siramon *et al.*, 2013). Essa característica de cromóforo foi aproveitada para criação de metodologias que determinassem a capacidade de uma amostra de proteger um substrato lipídico da oxidação (Duarte-Almeida *et al.*, 2006; Siramon *et al.*, 2013).

Neste ensaio da oxidação do β -caroteno/ácido linoleico avaliou-se a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico que atacam a molécula de β -caroteno altamente insaturada causando perda de suas características de cromóforo e, portanto, da cor laranja, conforme figura 4.17 (Husein *et al.*, 2014). O teste aplicado permite selecionar de maneira rápida extratos potencialmente relevantes na prevenção de doenças crônico-degenerativas (Duarte-Almeida *et al.*, 2006).

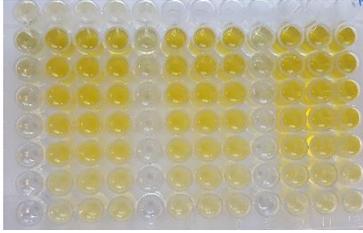


Figura 4.17 – Microplaca demonstrativa do ensaio de oxidação do β -caroteno /ácido linoléico ao final de 60 minutos. Fonte: Elaborada pela própria autora, Braga, Portugal, 2018.

As medidas espectrofotométricas da descoloração do β -caroteno induzidas pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico foram usadas para traçar as curvas referentes a porcentagem de redução da oxidação *versus* concentração dos extratos (figura 4.18).

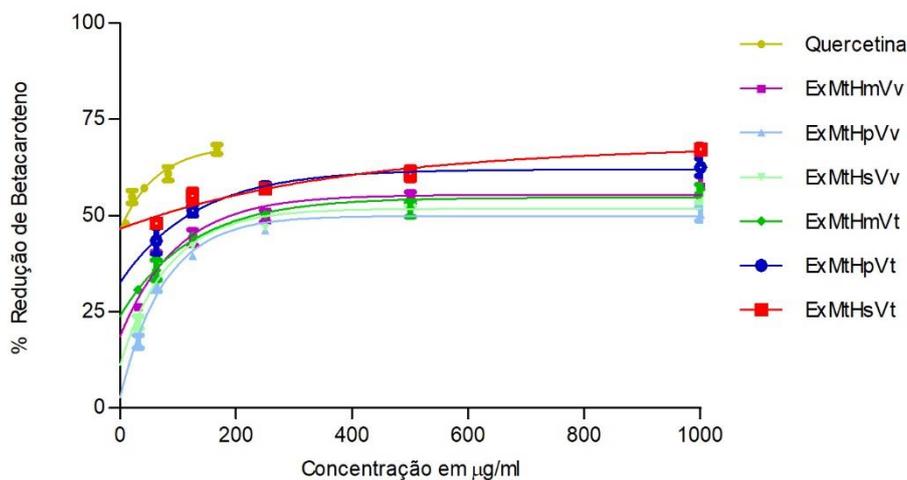


Figura 4.18 – Inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico pela ação antioxidante da quercetina e dos extratos metanólicos de plantas “*in vivo*” de *Hyptis marrubioides* (ExMtHmVv), *Hyptis pectinata* (ExMtHpVv) e *Hyptis suaveolens* (ExMtHsVv) e “*in vitro*” de *Hyptis marrubioides* (ExMtHmVt), *Hyptis pectinata* (ExMtHpVt) e *Hyptis suaveolens* (ExMtHsVt). Os valores são provenientes de três experimentos triplicados independentes e representados com média \pm erro padrão da média.

A partir das curvas, determinou-se a concentração de extrato efetiva (EC_{50}) que protege o β -caroteno da descoloração em 50% eliminando radicais livres provenientes da peroxidação do ácido linoleico (figura 4.19 e tabela 4.9). Quanto menor for o valor do EC_{50} , maior será a capacidade antioxidante dos extratos.

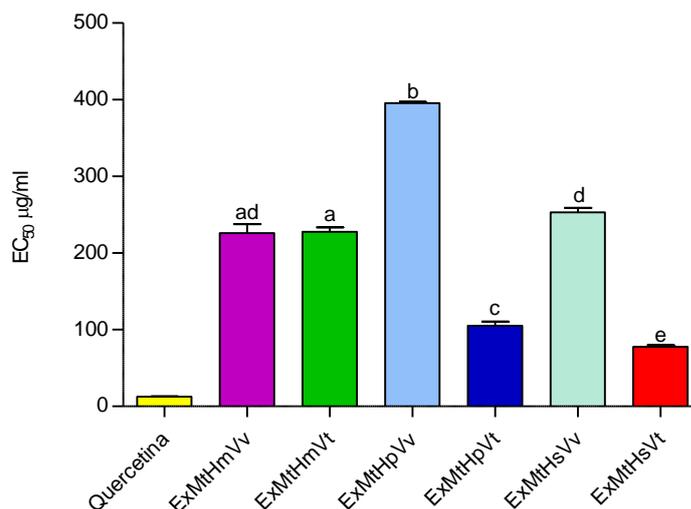


Figura 4.19 – EC₅₀ do padrão quercetina e dos extratos metanólicos de plantas “*in vivo*” de *Hyptis marruboides* (ExMtHmVv), *Hyptis pectinata* (ExMtHpVv) e *Hyptis suaveolens* (ExMtHsVv) e “*in vitro*” de *Hyptis marruboides* (ExMtHmVt), *Hyptis pectinata* (ExMtHpVt) e *Hyptis suaveolens* (ExMtHsVt). Cada coluna representa a média ± E.P.M. considerando os resultados obtidos a partir de três experimentos independentes. As amostras foram comparadas entre si pelo teste t. Todos os valores são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,005$), exceto aqueles marcados com a mesma letra.

Antioxidantes	EC ₅₀ (µg/ml)
Quercetina	12.60 ± 0.5292
<i>Hyptis marruboides in vivo</i> (ExMtHmVv)	226.0 ± 11.53
<i>Hyptis marruboides in vitro</i> (ExMtHmVt)	227.7 ± 5.783
<i>Hyptis pectinata in vivo</i> (ExMtHpVv)	395.7 ± 1.764
<i>Hyptis pectinata in vitro</i> (ExMtHpVt)	105.1 ± 5.622
<i>Hyptis suaveolens in vivo</i> (ExMtHsVv)	253.06 ± 6.083
<i>Hyptis suaveolens in vitro</i> (ExMtHsVt)	77.80 ± 2.011

Tabela 4.9 – Resultados da análise do Inibição betacaroteno. Os dados representam médias ± E.P.M. para três experimentos diferentes.

O valor EC₅₀ da quercetina foi significativamente menor que os dos extratos das *Hyptis* ($p \leq 0,005$), o que indica maior capacidade antioxidante do padrão. Todos os extratos interferiram na inibição da descoloração do β-caroteno. Observando a figura 4.19, nota-se que o resultado para o ExMtHmVv não demonstrou média significativamente diferente do ExMtHmVt, mesmo o primeiro apresentando maior teor de fenólicos. O contrário ocorreu com os ExMtHsVt e ExMtHpVt que demonstraram médias significativamente diferentes e melhores do que seus correspondentes extratos *in vivo*. Dos seis extratos analisados, os ExMtHsVt obtiveram o melhor resultado com EC₅₀=77,80 µg/ml, seguido de ExMtHpVt com EC₅₀=105,1 µg/ml.

Extratos de *Teucrium chamaedrys*, *T. montanum* e *T. polium* também exibiram atividade antioxidante no sistema β-caroteno/ácido linoleico melhor que o padrão – BHA (Panovska *et al.*,

2005). Contudo, essa atividade não estava relacionada com os níveis totais de flavonoides o que indica um possível sinergismo dos flavonoides com outros compostos presentes nos extratos e não identificados no estudo (Panovska et al., 2005).

Outras espécies da família Lamiaceae também apresentaram bons resultados para o ensaio do betacaroteno. Nickavar e colaboradores (2016), demonstraram que o extrato metanólico de *Salvia verticillata* exibiu forte efeito inibitório no branqueamento do β -caroteno de maneira dependente da concentração com EC_{50} de 194 $\mu\text{g/ml}$. Os extratos de acetato de etila das espécies de *Salvia albimaculata* ($EC_{50}=29,3 \mu\text{g/ml}$), *Salvia potentillifolia* ($EC_{50}=26,1 \mu\text{g/ml}$) e *Salvia nydeggeri* ($EC_{50}=32,6 \mu\text{g/ml}$) também apresentaram bons resultados para o ensaio sendo que foi notada uma correlação positiva com conteúdo de fenólicos totais (Kivrak et al., 2019).

4.4.7 Ensaio FRAP

O estresse oxidativo quando instaurado em nosso organismo, resulta em danos ao DNA e à proteína e na peroxidação lipídica que podem estar correlacionados ao aparecimento de câncer, doenças cardiovasculares, doenças de Alzheimer e Parkinson (Chan et al., 2008). Conforme a literatura, várias plantas vêm sendo estudadas por sua ação terapêutica associada a presença de antioxidantes, na ânsia de reduzir as incidências destas doenças por eliminação ou neutralização de EROs deletérios (Sylvie et al., 2014).

Existem vários métodos que analisam a capacidade antioxidante de um extrato vegetal em doar elétrons, ou seja, seu efeito redutor contra os efeitos oxidativos de espécies reativas de oxigênio. O método FRAP (poder antioxidante de redução dos íons ferro) é um destes métodos no qual os antioxidantes funcionam como redutores inativando oxidantes por meio de reações redox (Kumari e Padmaja, 2012). Ele mede a habilidade dos antioxidantes reduzirem o íon ferro III a ferro II na presença de tripiridiltriazina (TPTZ) (Stratil et al., 2006). A redução do complexo tripiridiltriazina férrica (FeIII-TPTZ) ao complexo ferroso tripiridiltriazina (FeII-TPTZ) em meio ácido deve ser monitorada a 593nm (Vázquez et al., 2008).

O aumento da absorvância é proporcional a capacidade antioxidante, cuja reação pode ser verificada visivelmente com a mudança de cor de azul claro para azul escuro (figura 4.20).

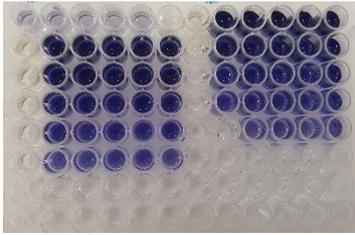


Figura 4.20 - Microplaca demonstrativa do ensaio FRAP. Fonte: Elaborada pela própria autora, Braga, Portugal, 2018.

Após leitura espectrofotométrica das microplacas, usou-se os dados obtidos para traçar as curvas referentes a porcentagem de redução do Fe^{3+} *versus* as concentrações dos extratos de *Hyptis* (figura 4.21).

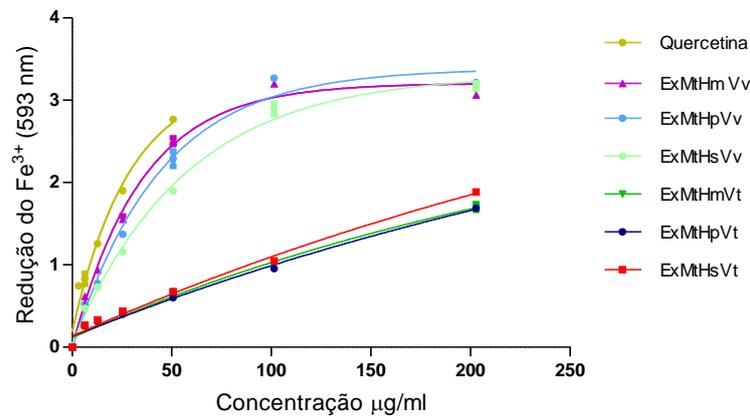


Figura 4.21 – Redução do Fe^{3+} pela ação de antioxidantes da quercetina e dos extratos metanólicos das plantas “*in vivo*” de *Hyptis marruboides* (ExMtHmVv), *Hyptis pectinata* (ExMtHpVv) e *Hyptis suaveolens* (ExMtHsVv) e “*in vitro*” de *Hyptis marruboides* (ExMtHmVt), *Hyptis pectinata* (ExMtHpVt) e *Hyptis suaveolens* (ExMtHsVt). Os valores são provenientes de três experimentos triplicados independentes e representados com média \pm E.P.M.

A partir das curvas, descobriu-se a concentração efetiva de extrato (EC_{50}) para redução do Fe^{3+} (figura 4.22 e tabela 4.10).

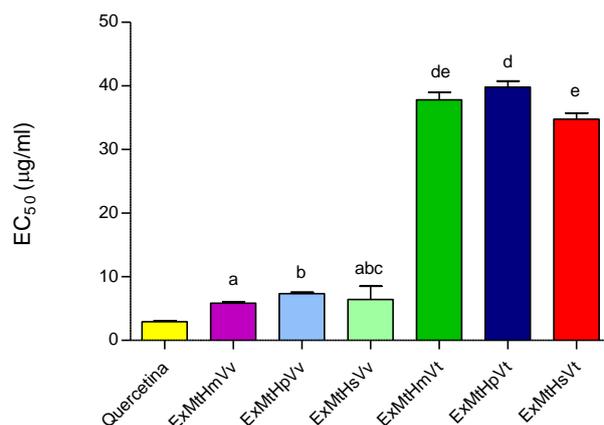


Figura 4.22 – EC₅₀ do padrão quercetina e dos extratos metanólicos de plantas “*in vivo*” de *Hyptis marruboides* (ExMtHmVv), *Hyptis pectinata* (ExMtHpVv) e *Hyptis suaveolens* (ExMtHsVv) e “*in vitro*” de *Hyptis marruboides* (ExMtHmVt), *Hyptis pectinata* (ExMtHpVt) e *Hyptis suaveolens* (ExMtHsVt). Cada barra representa a média ± E.P.M. considerando os resultados obtidos a partir de três experimentos independentes. As amostras foram comparadas entre si pelo teste t. Todos os valores são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,005$), exceto aqueles marcados com a mesma letra.

A partir dos resultados, verificou-se que a quercetina apresentou a melhor EC₅₀ (2,93 µg/ml). O ExMtHmVv e o ExMtHsVv apresentaram EC₅₀ de 5,83 µg/ml e 6,42 µg/ml, respectivamente, melhores dos que os outros extratos *Hyptis* ($p \leq 0,005$), o que indica maior capacidade redutora Fe³⁺. Analisando a tabela 4.10, verifica-se que os extratos *in vivo* demonstraram médias significativamente melhores do que seus extratos *in vitro*. Todos os extratos demonstraram uma possível capacidade antioxidante baseada na redução dos íons férricos.

Antioxidantes	EC ₅₀ (µg/ml)
Quercetina	2.93 ± 0.185
<i>Hyptis marruboides in vivo</i> (ExMtHmVv)	5.83 ± 0.211
<i>Hyptis marruboides in vitro</i> (ExMtHmVt)	37.83 ± 1.146
<i>Hyptis pectinata in vivo</i> (ExMtHpVv)	7.36 ± 0.214
<i>Hyptis pectinata in vitro</i> (ExMtHpVt)	39.83 ± 0.935
<i>Hyptis suaveolens in vivo</i> (ExMtHsVv)	6.42 ± 2.117
<i>Hyptis suaveolens in vitro</i> (ExMtHsVt)	34.76 ± 0.949

Tabela 4.10 – Valores EC₅₀ dos extratos metanólicos de *Hyptis* no ensaio FRAP. Os dados representam médias ± E.P.M. para três experimentos

Estes resultados confirmam os de Ghaffari e colaradores (2014) quanto a capacidade do extrato metanólico de *H. suaveolens* em reduzir o complexo Fe (III) para Fe (II). Os autores ainda dizem que o potencial dos extratos para reduzir o Fe³⁺ pode ser atribuída à presença de polifenóis e flavonoides. Este potencial pode estar relacionado a capacidade dos fenólicos de provocar a ruptura da cadeia de radicais livres ao doar um átomo de hidrogênio e, também, ao número e/ou a posição da molécula de hidroxila nesses grupos (Asokkumar *et al.*, 2009; Dai e Mumper, 2010; Alzahrani *et al.*, 2012; Sylvie *et*

al., 2014; Adebisi *et al.*, 2017). Segundo Stratil e colaboradores (2006) a capacidade antioxidante das substâncias fenólicas neste método aumenta de acordo com o número de grupos hidroxila. O extrato etanólico de *H. rhomboidea* também exibiu significativa atividade redutora de ferro e, de acordo com Li e colaboradores (2018), estudos mais aprofundados são fundamentais para definir à qual composto se deve essa capacidade. Embora haja alguns estudos sobre a atividade FRAP com *Hyptis*, até onde sabemos, Hm e Hp não foram relatadas anteriormente.

As atividades antioxidantes dos extratos metanólicos de 9 espécies de *Salvia* (*S. santolinifolia*, *S. eremophila*, *S. palestina*, *S. multicaulis*, *S. hydrangea*, *S. syriaca*, *S. virgata*, *S. reuterana*, *S. macrosiphon*) e 15 outras plantas de Lamiaceae (*Gontscharovia popovii*, *Otostegia michauxii*, *Thymus daenensis*, *Phlomis elliptica*, *Phlomis olivieri*, *Marrubium vulgare*, *Teucrium polium*, *Marrubium astracanicum*, *Sideritis montana*, *Ballota aucheri*, *Phlomis persica*, *Eremostachys adenantha*, *Phlomis bruguieri*, *Scutellaria multicaulis*, *Ajuga chamaecistus*, *Ballota aucheri*, *Phlomis persica*, *Eremostachys adenantha*, *Scutellaria multicaulis*, *Ajuga chamaecistus*) originárias do Irã, também, apresentaram atividade FRAP (Firuzi *et al.*, 2010).

4.5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos comparados a diversos estudos de *Hyptis* confirmam que extratos de folhas destas espécies são importantes fontes de compostos bioativos, como ácidos fenólicos e flavonoides, sendo o ácido rosmarínico, o composto majoritário nas espécies *in vivo* e *in vitro*. As propriedades antioxidante dos extratos Hm, Hp e Hs *in vivo* e *in vitro* se manifestam nas diferentes metodologias utilizadas. Portanto, essas plantas podem ser consideradas fontes naturais de compostos com propriedades farmacológicas que podem ser aplicadas no tratamento de diferentes problemas associados ao estresse oxidativo.

Capítulo 5

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS DE *Hyptis* spp.

5. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS DE *Hyptis* spp.

5.1 INTRODUÇÃO

Com a descoberta do primeiro antibiótico em 1928, a penicilina, várias infecções bacterianas passaram a ser tratadas de forma eficaz, ocasionando uma verdadeira onda de otimismo na medicina (Livermore, 2004; Zinner, 2005; Silver, 2011; Munita e Arias, 2016). Indiscutivelmente, a implementação da terapia antimicrobiana na prática clínica tem sido um dos avanços mais bem-sucedidos da medicina moderna, abrindo o caminho para intervenções médicas complexas e bastante sofisticadas que permitiram prolongar o tempo de vida da população em todo o mundo (Munita e Arias, 2016). Contudo, o uso de antibacterianos passou a ocorrer de forma indiscriminada e prolongada promovendo um processo de seleção de microrganismos patogênicos e multirresistentes à maioria dos compostos químicos comumente utilizados na medicina ((Zinner, 2005; Chattopadhyay *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2009; Carlet *et al.*, 2012; Munita e Arias, 2016).

Apesar de inúmeras indústrias farmacêuticas se dedicarem à produção de novos antibióticos, o ritmo de desenvolvimento da resistência bacteriana em diferentes cepas tem crescido a uma velocidade maior que o isolamento de compostos ativos (Carlet *et al.*, 2012; Frieri *et al.*, 2017), representando um importante problema à saúde humana (Aminov, 2010; Munita e Arias, 2016). No intuito de contornar essa situação, estudos visam um antibacteriano ideal que confira uma melhor atividade, uma menor toxicidade, um menor custo e uma menor sensibilidade aos mecanismos de resistência (Chopra *et al.*, 2002; Aminov, 2010).

Nesse contexto, as plantas podem ser uma alternativa interessante para direcionar a busca por compostos promissores (Bertucci *et al.* 2009). Elas possuem várias vias metabólicas secundárias que dão origem a diversos compostos como alcaloides, flavonoides, ácidos fenólicos, estibenos, taninos, cumarinas, carotenóides, que por vezes, são específicos de determinadas famílias, gêneros ou espécies (Veberič, 2010). Esses compostos além de serem de suma importância no mecanismo de defesa da planta contra predação por microrganismos, insetos e herbívoros, em testes *in vitro*, têm demonstrado

propriedades antimicrobianas e podem servir como alternativa antibacteriana eficaz, menos dispendiosa e segura para o tratamento de infecções microbianas (Chattopadhyay *et al.*, 2009).

O Brasil é detentor de uma biodiversidade promissora, a maior do mundo (Dutra *et al.*, 2016), como fonte de produtos naturais bioativos, cujo potencial terapêutico é pobremente explorado ou regulamentado, contrastando com o que ocorre em países desenvolvidos (Veiga Júnior, 2005; Ricardo *et al.*, 2017). Muitas dessas espécies vegetais, portanto, são empregadas como medicamentos naturais sem qualquer respaldo científico quanto à sua eficácia e segurança, o que demonstra a enorme lacuna entre a oferta de plantas e as pesquisas que validem o seu uso popular (Foglio *et al.*, 2006). Na intenção de colaborar com as investigações científicas voltadas a ação antimicrobiana, desenvolvemos este estudo com plantas *Hyptis* oriundas do Brasil.

Várias espécies de *Hyptis* possuem comprovada atividade antibacteriana (Goly *et al.*, 2015; Salini *et al.*, 2015; Flores *et al.*, 2014; Tesch *et al.*, 2015; Bachheti *et al.*, 2015; Kerdudo *et al.*, 2016; Andrade *et al.*, 2017b; De Figueirêdo *et al.*, 2018). Entre os fatores determinantes da sua atividade biológica destaca-se o teor e o tipo de compostos fenólicos encontrados nos óleos essenciais e extratos de suas várias espécies (Tafurt-Garcia *et al.*, 2015). Conforme a literatura, há investigações realizadas com *H. atrorubens*, *H. brevipes*, *H. crenata*, *H. columbiana*, *H. capitata*, *H. fasciculata*, *H. martiusi*, *H. mutabilis*, *H. pectinata*, *H. rhomboidea*, *H. verticilata* e *H. suaveolens*, sendo essa última a mais estudada.

Como existem aproximadamente 400 espécies de *Hyptis*, podemos afirmar que há uma escassez considerável de trabalhos relacionados à atividade antibacteriana quando verificamos a literatura. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial antibiótico de extratos metanólicos, de acetato de etila e de diclorometano elaborados a partir de folhas de *Hyptis marrubioides*, *Hyptis pectinata* e *Hyptis suaveolens*, frente as cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™), *Staphylococcus aureus* (ATCC® 29213™), *Escherichia coli* (ATCC® 10536™), *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), *Salmonella Cholerasuis* (ATCC® 10708™), *Salmonella Typhimurium* (ATCC® 13311™), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 9027™) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853™).

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Obtenção e identificação do material vegetal

As folhas de *Hyptis marrubiodes* (Hm), *Hyptis pectinata* (Hp) e *Hyptis suaveolens* (Hs) foram coletadas no campo experimental do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano (IFGoiano), Campus Rio Verde, nas coordenadas aproximadas de 17°48'3,81''S e 50°54'0,07''W; 17°48'3,94''S e 50°53'9,99''W e 17°48'3,81''S e 50°54'0,01''W, respectivamente, no período da manhã do dia 05 de março de 2014. Exsiccatas das três espécies coletadas foram depositadas no Herbário do IFGoiano sob os códigos 476, 477 e 492, respectivamente. O material vegetal foi seco em estufa de circulação de ar a 35°C, até peso constante para estabilização da biomassa. Posteriormente este foi moído em moinho de facas, acondicionado em sacos plásticos, selados, identificados e mantidos em câmara fria a -20° C, até a preparação dos extratos.

5.2.2 Preparação dos extratos metanólico, acetato de etila e diclorometano de *Hyptis* spp.

A biomassa vegetal de cada amostra *in vivo* foi macerada, separadamente por espécie, em metanol na proporção de 40 gramas de biomassa seca para 400 ml de metanol 80% (1:10), homogeneizada no banho de ultrassom por 15 minutos e estocada por 7 dias no escuro e à temperatura ambiente. A biomassa foi separada da solução por filtração com uso de uma bomba à vácuo, remacerada com 200 ml de metanol 80% e estocada por 7 dias. Ao fim deste prazo, a biomassa foi filtrada e a solução resultante, juntamente com a da primeira extração, foram evaporadas, congeladas a -80° C e liofilizadas por 72 horas. O extrato seco foi guardado sob refrigeração até a realização dos ensaios microbiológicos. Repetiu-se este processo de extração usando como solvente o acetato de etila e, *a posteriori*, com diclorometano obtendo-se assim extratos metanólicos, extratos de acetato de etila e extratos de diclorometano.

O rendimento dos extratos foi calculado a partir da relação do peso final da amostra após a extração (PF) multiplicado por 100 e dividido pelo peso inicial da amostra antes da extração (PI) (Rodrigues *et al.*, 2011), conforme a fórmula: % rendimento= (PFx100)/PI.

5.2.3 Microrganismos

Para realização dos procedimentos microbiológicos foram empregadas cepas de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC®), na segunda passagem, obtidas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil, representativas dos grupos bacterianos Gram-positivos e Gram-negativos (Tabela 5.1).

Cepa de Referência	Abreviatura no Texto
Bactérias Gram Positivas	
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 25923™)	<i>S. aureus</i> (ATCC® 25923™)
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (ATCC® 29213™)	<i>S. aureus</i> (ATCC® 29213™)
Bactérias Gram Negativas	
<i>Escherichia coli</i> (ATCC® 10536™)	<i>E. coli</i> (ATCC® 10536™)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC® 25922™)	<i>E. coli</i> (ATCC® 25922™)
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Cholerasuis (ATCC® 10708™)	<i>S. Cholerasuis</i> (ATCC® 10708™)
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium (ATCC® 13311™)	<i>S. Typhimurium</i> (ATCC® 13311™)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC® 9027™)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC® 9027™)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC® 27853™)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC® 27853™)

Tabela 5.1 – Cepas Gram positivas e Gram negativas de referência da *American Type Culture Collection* utilizadas nos testes antimicrobianos com extratos de Hm, Hp e Hs.

5.2.4 Avaliação da atividade antibacteriana e preparação dos inóculos

Os ensaios de atividade antibacteriana foram realizados no Laboratório de Bioatividade Celular e Molecular, localizado no Centro de Pesquisas Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFJF, sob a orientação da Professora Doutora Maria Silvana Alves. A atividade bacteriana foi investigada por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM), bem como pela classificação do efeito antibacteriano das amostras em bactericida ou bacteriostático.

Até a realização dos ensaios biológicos, as cepas de referência foram mantidas congeladas a -20°C em tubos plásticos com tampas de rosca próprios para congelamento (Inlab), sob forma de suspensões densas contendo leite desnatado a 10% (p/v) acrescido de glicerol (Synth) a 10% (v/v).

Para preparação dos inóculos, as cepas de referência foram inicialmente ativadas em ágar Müeller-Hinton (Himedia Laboratories®, Mumbai, Índia) e incubadas por 16 a 18 horas em estufa bacteriológica a 35±2°C, em aerobiose. Após incubação, 3 a 5 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foram transferidas para um tubo de ensaio 13x100 mm contendo 3,5 ml de solução salina estéril (NaCl 0,9% p/v), comparadas visualmente e ajustadas à escala padrão 0,5 de McFarland (DME Diagnósticos

Microbiológicos Especializados®, São Paulo, SP, Brasil) (CLSI, 2012). A turbidez do inóculo bacteriano foi confirmada em espectrofotômetro (Bel Spectro S05) (BEL® Photonics do Brasil, SP, Brasil). A leitura da absorbância deve estar entre 0,08 e 0,13 em 625 nm para corresponder a 0,5 da escala de McFarland (CLSI, 2012).

5.2.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O método de microdiluição em caldo foi utilizado para determinação da CIM conforme as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012 e 2014), com alguns ajustes. Para o preparo da solução estoque dos extratos (SE) a 10 mg.ml^{-1} , pesou-se 10 mg do extrato seco que foram transferidos para eppendorf de capacidade 1,5-2 ml. Em seguida, foram acrescentados 20 μl de DMSO, cuja a concentração final não ultrapassou 2%, seguidos de 20 μl de Tween 80. Finalmente, foram adicionados 100 μl de etanol 99,5% e 860 μl de água destilada, completando o volume final de 1000 μl . A partir da SE, foram feitas diluições seriadas diretamente nas microplacas obtendo um gradiente de concentração de 0,04 a 5 mg.ml^{-1} .

Já o antibiótico ampicilina sódica (AMP) (Sigma-Aldrich) foi solubilizado em tampão fosfato 0,1M (pH8,0) e diluído em tampão fosfato 0,1M (pH6,0) enquanto que o antibiótico cloranfenicol (CHL) (Sigma-Aldrich) foi solubilizado em etanol 95% e diluído em água destilada estéril, no intuito de se obter concentração final de 1mg/ml em ambos os antibióticos. As diluições seriadas foram feitas nas microplacas obtendo um gradiente de concentração de 0,004 a $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$.

Nas placas as diluições seriadas para extratos, AMP e CLH ocorreram da mesma forma. Os poços da microplaca receberam 100 μl de caldo Müller Hinton (CMH) (Difco Laboratories®, Spark, MD, USA). A seguir adicionou-se 100 μl da SE do extrato em quatro poços da linha A e homogeneizou-se. Após a homogeneização, 100 μl de cada um desses poços foram transferidos para da linha B, depois de B para C e assim sucessivamente até chegar a linha H. Nesta última linha desprezou-se o volume de 100 μl . Finalizada as diluições seriadas, em quadruplicata para os extratos e em triplicata para os antibióticos, acrescentou-se 10 μl da suspensão bacteriana previamente padronizada.

Como substâncias contidas no meio podem interferir nos resultados do estudo microbiológico, foram preparadas microplacas contendo os controles para aferição da interferência das amostras

(extratos e antibióticos) sobre o CMH (IAM) e dos sistemas solvente/diluyente sobre o CMH (ISM) e do crescimento bacteriano (ISC). Além destes controles, prepararam-se os controles positivo (CP) e negativo (CN).

Para preparação dos controles de interferência, adicionou-se aos poços 100 µl de CMH e a seguir, para IAM adicionou-se 100 µl de SE (extrato ou antibiótico), desprezou-se 100 µl e colocou-se 10 µl de solução salina; para ISM adicionou-se 100 µl de solvente/diluyente, desprezou-se 100 µl e colocou-se 10 µl de solução salina; para o ISC adicionou-se 100 µl de solvente/diluyente (da ampicilina-ISC1, do cloranfenicol-ISC2, do extrato-ISC3) , desprezou-se 100 µl e colocou-se 10 µl de suspensão bacteriana. Já para o controle positivo, acrescentou-se a um poço com 100 µl de CMH, 10 µl de suspensão bacteriana enquanto que para o controle negativo, acrescentou-se 100 µl de CMH e 10 µl de solução salina. Os testes foram realizados em triplicata para os extratos e antibióticos utilizando microplacas de 96 poços de fundo chato que foram organizadas conforme Figura 5.1.

As microplacas foram incubadas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, em aerobiose, de 16 a 20 horas. Finalizado o prazo, adicionou-se de 10 µl de solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT) (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 1mg/ml nos poços, tendo o cuidado de não o colocar na última coluna de cada tratamento, cujos poços foram reservados para o teste de determinação da CBM e para classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático. As microplacas foram incubadas por 30 min. a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, em aerobiose e, a seguir, procedeu-se a leitura visual que foi realizada por meio da verificação mudança de cor do revelador CTT. Os poços que apresentaram coloração rosa a avermelhada indicaram crescimento bacteriano e os que não sofreram alteração da cor, ausência de crescimento. A CIM foi determinada pela menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento visível de um microrganismo (CLSI, 2012).

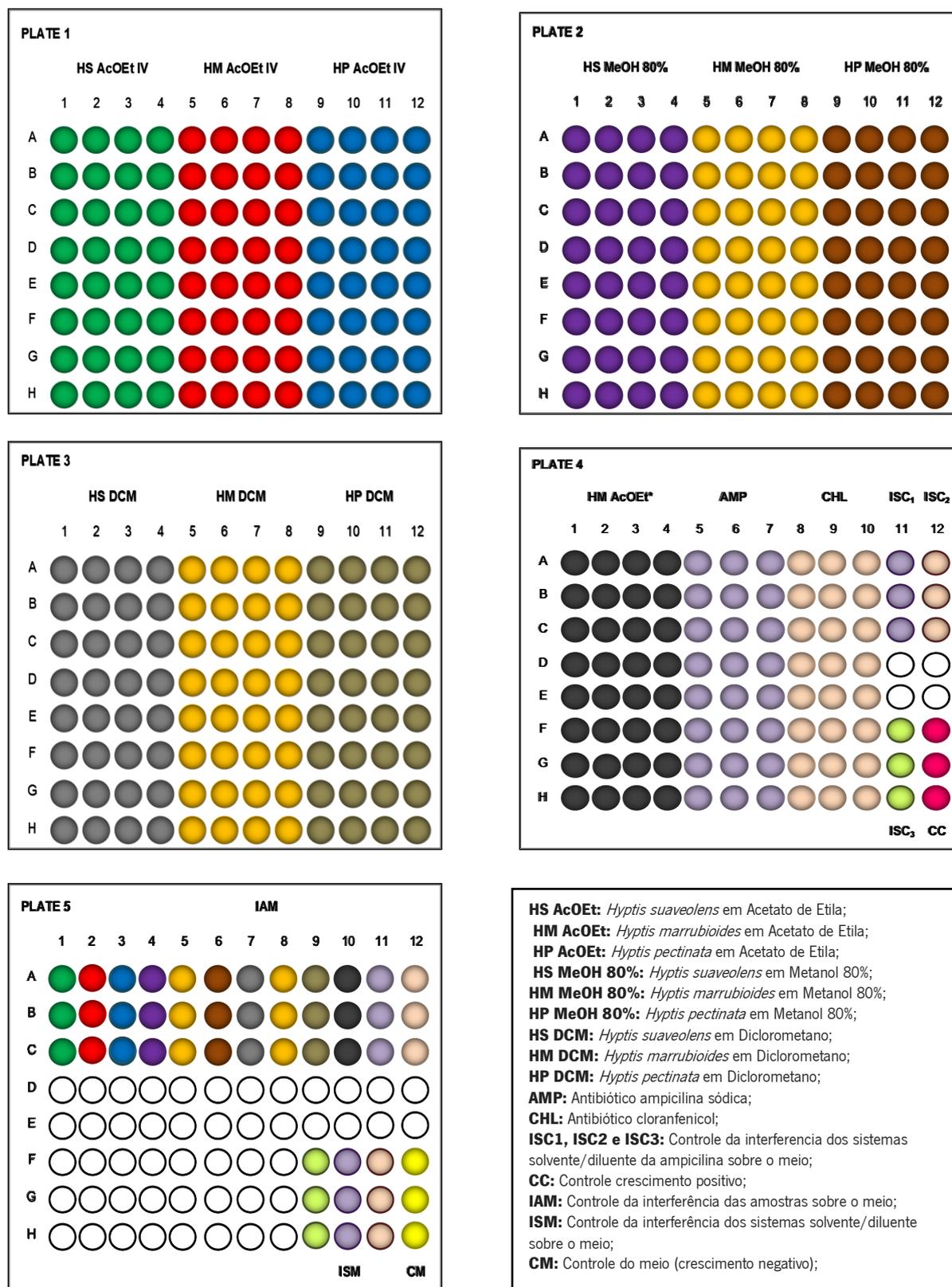


Figura 5.1 – Imagem ilustrativa da organização das microplacas utilizadas no ensaio de determinação da concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição em caldo dos extratos metanólicos, de acetato de etila e de diclorometano das folhas de Hm, Hp e Hs. As concentrações dos extratos foram de 5 mg.ml⁻¹ (linha A), 2,5 mg.ml⁻¹ (linha B), 1,25 mg.ml⁻¹ (linha C), 0,63 mg.ml⁻¹ (linha D), 0,31 mg.ml⁻¹ (linha E); 0,16 mg.ml⁻¹ (linha F); 0,08 mg.ml⁻¹ (linha G); 0,04 mg.ml⁻¹ (linha H).

5.2.6 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático.

Determinou-se a Concentração Bactericida Mínima (CBM) seguida da classificação do efeito antibiótico como bactericida ou bacteriostático conforme o método descrito por Andrews (2001), com substituição do meio de cultura utilizado [IsoSensitest Agar (ISA; Oxoid, Basingstoke, UK) por Ágar Müller Hinton (AMH; Difco® Laboratories, Spark, MD, USA)]. Após a identificação das fileiras que não apresentaram alteração da coloração, supostamente por não haver crescimento bacteriano, utilizou-se o quarto poço correspondente (sem CTT) para determinação da CBM, ou seja, a menor concentração do extrato capaz de causar a morte das células bacterianas e para a classificação dos efeitos antibacterianos. Foram retirados 10 µl do conteúdo do poço com auxílio de alça microbiológica calibrada estéril descartável. As amostras colhidas foram estriadas em placas de Petri contendo ágar Müller Hinton (AMH) e incubadas em estufa a $35\pm 2^\circ\text{C}$, de 18 a 20 horas, em aerobiose. Após a incubação, verificou-se visualmente a presença ou ausência de crescimento bacteriano. As concentrações de extrato que permitiram o crescimento bacteriano no AMH foram definidas como bacteriostáticas e aquelas que inibiram o crescimento das bactérias como bactericidas.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Rendimento dos extratos metanólicos de *Hyptis* spp.

O rendimento dos extratos das folhas de Hm, Hp e Hs obtidos a partir de 40 g de folhas secas em estufa de circulação de ar a 35°C e trituradas em moinho de facas foi calculado após término da remoção do solvente, em porcentagem (%). De acordo com a Tabela 5.1 os maiores rendimentos para extrato metanólico (11,4%) e diclorometano (1,58%) ocorreram para Hm enquanto que para os extratos de acetato de etila (6,36%) Hp foi a que mais se destacou. O maior rendimento com o metanol (solvente mais polar), indica que os compostos bioativos presentes na planta apresentam características mais polares.

Espécie	Extratos das folhas	Peso do extrato (g)	Rendimento (%)
<i>Hyptis marruboides</i>	MeOH	4,56	11,40
	Acetato de etila	0,95	2,36
	Diclorometano	0,63	1,58
<i>Hyptis pectinata</i>	MeOH	3,78	9,45
	Acetato de etila	2,54	6,36
	Diclorometano	0,30	0,75
<i>Hyptis suaveolens</i>	MeOH	3,86	9,64
	Acetato de etila	1,23	3,06
	Diclorometano	0,27	0,67

Tabela 5.2 - Valores do peso (g) e dos rendimentos (%) dos extratos metanólicos, de acetato de etila e de diclorometano obtidos de folhas de Hm, Hp e Hs.

5.3.2 Atividade antibacteriana de *Hyptis* spp.

O aumento do número de patógenos resistentes aos antibióticos é uma das mais graves ameaças à saúde global neste século (Prestinaci *et al.*, 2015). Diante dessa realidade, a OMS, buscando guiar a pesquisa, a descoberta e o desenvolvimento de novos antibióticos, publicou uma lista de patógenos prioritários que classifica 20 bactérias em três grupos estratificados como prioridade crítica (1), alta (2) e média (3) (Tabela 5.3) (WHO, 2017). Por esta razão, neste estudo, trabalhou-se com bactérias de prioridade 1 e prioridade 2.

Prioridade 1 CRÍTICA	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Acinetobacter baumannii</i> resistente à carbapenema • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente à carbapenema • Enterobacteriaceae resistente à carbapenema, resistente às cefalosporinas de 3ª geração
Prioridade 2 ALTA	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterococcus faecium</i> resistente à vancomicina • <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina, com sensibilidade intermediária e resistente à vancomicina • <i>Helicobacter pylori</i> resistente à claritromicina • <i>Campylobacter</i> resistente à fluoroquinolona • <i>Salmonella</i> spp. resistente à fluoroquinolona • <i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistente às cefalosporinas de 3ª geração, resistente à fluoroquinolona
Prioridade 3 MÉDIA	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptococcus pneumoniae</i> sem susceptibilidade à penicilina • <i>Haemophilus influenzae</i> resistente à ampicilina • <i>Shigella</i> spp. resistente à fluoroquinolona

Tabela 5.3 – Lista de patógenos prioritários publicada pela organização mundial da saúde em 2017 para guiar a pesquisa, a descoberta e o desenvolvimento de novos antibióticos. Fonte: Adaptado de WHO (2017).

No método da diluição em caldo para determinação da CIM, os poços que exibiram coloração rosa a avermelhada representaram o crescimento microbiano e os poços que não exibiram alteração na

sua coloração permanecendo com a cor original, indicaram inibição do crescimento microbiano. Esses últimos retrataram a menor diluição dos extratos capaz de inibir o crescimento visível das cepas testadas e, portanto, tiveram o quarto poço correspondente selecionado para testes posteriores (Figura 5.2).

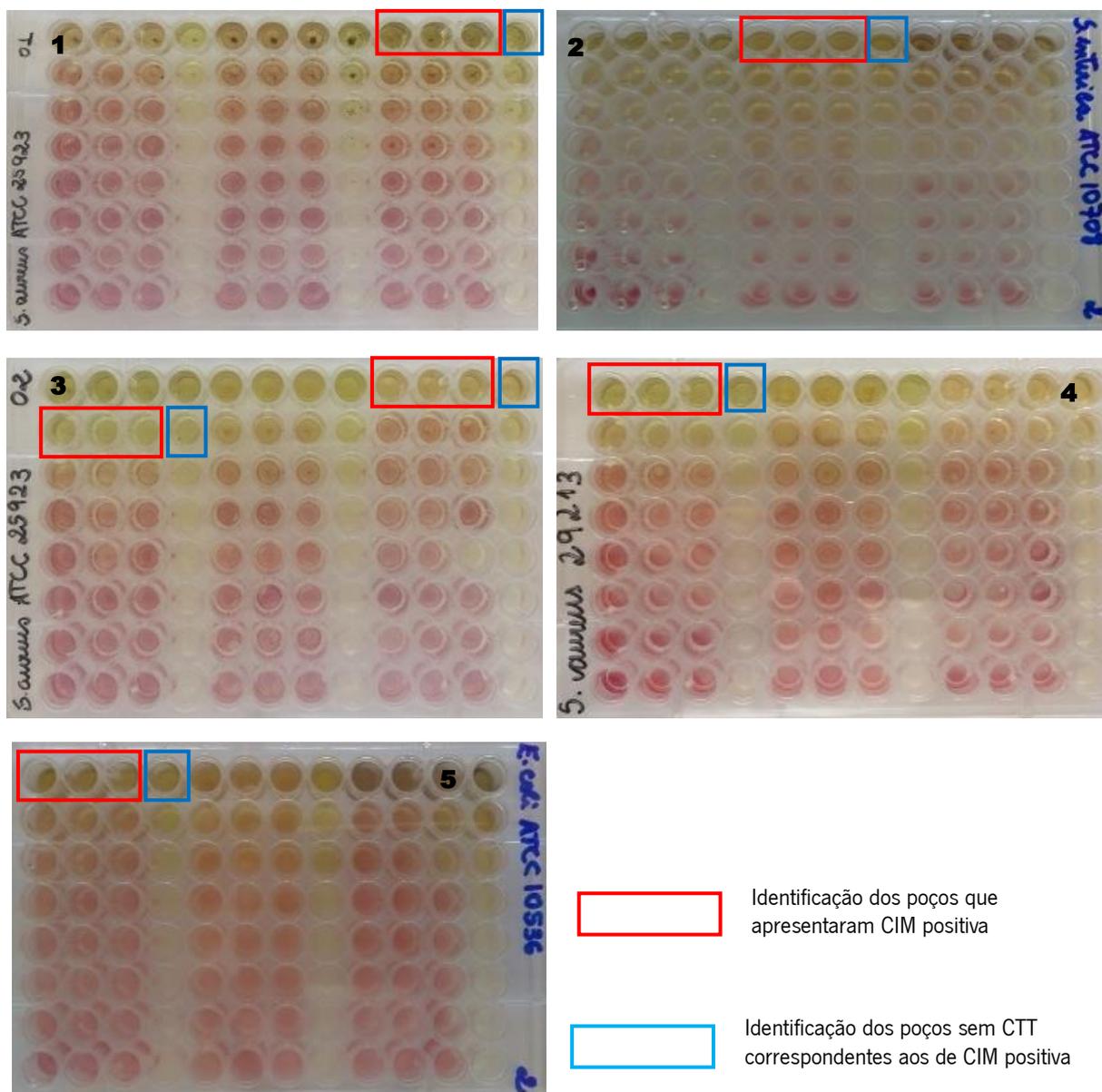


Figura 5.2 – Fotos identificando os poços que apresentaram a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano (CIM) e os poços sem CTT dos quais coletou-se amostra para determinação da CBM e dos efeitos bactericidas e bacteriostáticos. 1) extrato Hp de acetado de etila a 5 mg.ml^{-1} + *S. aureus* (ATCC® 25923™), 2) extrato Hm metanólico 80% a 5 mg.ml^{-1} , 3) extrato Hs metanólico 80% a $2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ + *S. aureus* (ATCC® 25923™) e extrato Hp metanólico 80% a 5 mg.ml^{-1} + *S. aureus* (ATCC® 25923™), 4) extrato Hs metanólico 80% a 5 mg.ml^{-1} + *S. aureus* (ATCC® 29213™), 5) extrato Hs metanólico 80% a 5 mg.ml^{-1} + *E. coli* (ATCC® 10536™).

Algumas das placas de petri semeadas com o conteúdo dos poços sem tratamento com CTT e CIM positiva para verificação da CBM e classificação do efeito farmacológico em bactericida ou bacteriostático foram apresentadas na figura 5.3.

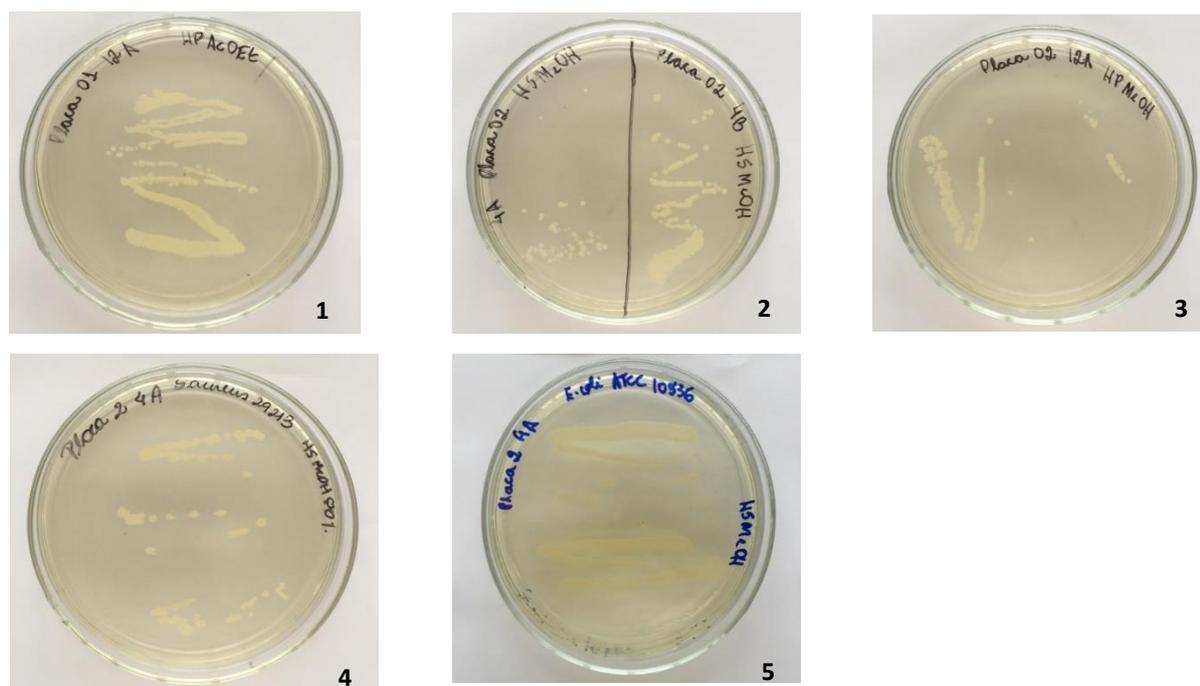


Figura 5.3. Fotos das placas utilizadas para a determinação da CBM e para caracterização do efeito farmacológico em bactericida ou bacteriostático. 1) extrato Hp de acetado de etila a 5 mg.ml⁻¹ + *S. aureus* (ATCC® 25923™), 2) extrato Hs metanólico 80% a 2,5 e 5 mg.ml⁻¹ + *S. aureus* (ATCC® 25923™), 3) extrato Hp metanólico 80% a 5 mg.ml⁻¹ + *S. aureus* (ATCC® 25923™), 4) extrato Hs metanólico 80% a 5 mg.ml⁻¹ + *S. aureus* (ATCC® 29213™), 5) extrato Hs metanólico 80% a 5 mg.ml⁻¹ + *E. coli* (ATCC® 10536™).

Conforme apresenta a Tabela 5.4, de todas as amostras testadas, o extrato metanólico de Hs apresentou a menor CIM (2,5 mg.ml⁻¹) contra *S. aureus* (ATCC® 25923™) e efeito bacteriostático, não sendo possível determinar a CBM em função do gradiente de concentração estabelecido (0,004 mg.ml⁻¹ < CIM < 5 mg.ml⁻¹). Também exibiu CIM de 5 mg.ml⁻¹ e ação bacteriostática para *S. aureus* (ATCC® 29213™) e *E. coli* (ATCC® 10536™). Segundo Kuete (2010), os valores de CIM poderiam ser usados como critério para classificação da atividade antimicrobiana. Segundo este autor, a classificação da atividade dos extratos vegetais será significativa se CIM < 0,1 mg.ml⁻¹, moderada se 0,1 < CIM ≤ 0,625 mg.ml⁻¹ ou fraca se CIM > 0,625 mg.ml⁻¹. Assim, apesar do efeito antibiótico observado ser considerado fraco segundo Kuete (2010), Fabry e colaboradores (1998) reportaram que plantas utilizadas na medicina tradicional no tratamento de infecções são consideradas ativas quando apresentarem uma CIM menor que 8mg.ml⁻¹. Ainda, Goly e colaboradores (2015) obtiveram resultados parecidos para o extrato etanólico de Hs a 70%, onde CIM ficou em 3,12 mg.ml⁻¹ para *S. aureus* (ATCC® 25923™) e CBM de 12,50 mg.ml⁻¹.

	Espécie	<i>Hyptis marrubioides</i>			<i>Hyptis pectinata</i>			<i>Hyptis suaveolens</i>			AMP	CHL
		Extrato	MeOH	AcOet	DCM	MeOH	AcOet	DCM	MeOH	AcOet		
<i>S. aureus</i> (ATCC® 25923™)	CIM	>5	>5	>5	5	5	>5	2,5	>5	>5	<4	8
	Efeito	ND	ND	ND	Btc	Btc	ND	Btc	ND	ND	NA	NA
	CBM	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	NA	NA
<i>S. aureus</i> (ATCC® 29213™)	CIM	>5	>5	>5	>5	>5	>5	5	>5	>5	<4	8
	Efeito	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Btc	ND	ND	NA	NA
	CBM	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	NA	NA
<i>E. coli</i> (ATCC® 10536™)	CIM	>5	>5	>5	>5	>5	**	5	>5	**	<4	8
	Efeito	ND	ND	ND	ND	ND	**	Btc	ND	**	NA	NA
	CBM	>5	>5	>5	>5	>5	**	>5	>5	**	NA	NA
<i>E. coli</i> (ATCC® 25922™)	CIM	>5	>5	>5	>5	>5	**	>5	>5	**	<4	8
	Efeito	ND	ND	ND	ND	ND	**	ND	ND	**	NA	NA
	CBM	>5	>5	>5	>5	>5	**	>5	>5	**	NA	NA
<i>S. Choleraesuis</i> (ATCC® 10708™)	CIM	5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	<4	8
	Efeito	Btc	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA
	CBM	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	NA	NA
<i>S. Typhimurium</i> (ATCC® 13311™)	CIM	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	**	<4	8
	Efeito	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	**	NA	NA
	CBM	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	**	NA	NA
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC® 9027™)	CIM	**	**	5	**	**	**	**	**	**	<4	8
	Efeito	**	**	Btc	**	**	**	**	**	**	NA	NA
	CBM	**	**	>5	**	**	**	**	**	**	NA	NA
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC® 27853™)	CIM	**	**	5	**	**	**	**	**	**	<4	8
	Efeito	**	**	Btc	**	**	**	**	**	**	NA	NA
	CBM	**	**	>5	**	**	**	**	**	**	NA	NA

Tabela 5.4. Concentração inibitória mínima (CIM), efeitos bacteriostáticos e concentração bactericida mínima (CBM) de extratos metanólicos, de acetato de etila e diclorometano de Hm, Hp e Hs. CIM e CBM são expressos em mg.ml⁻¹. MeOH: metanol, AcOet: acetato de etila, DCM: diclorometano, Btc: bacteriostático, Amp: ampicilina, CHL: clorafenicol, NA: não aplicado, ND: não determinado e **: amostras em quantidade insuficiente para análise.

O extrato metanólico de Hm, por sua vez, mostrou CIM de 5mg.ml⁻¹ e efeito bacteriostático contra *S. Choleraesuis* (ATCC® 10708™) enquanto que seu extrato de diclorometano exibiu CIM de 5mg/ml e efeito bacteriostático para *P. aeruginosa* (ATCC® 9027™) e (ATCC® 27853™). Como descrito anteriormente, estes valores correspondem a uma atividade antibacteriana fraca, mas que não pode ser

desconsiderada visto que esses microrganismos estão classificados como prioridade elevada e crítica da OMS para a pesquisa, descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos. Finalmente, o extrato metanólico e de acetato de etila de Hp teve efeito bacteriostático e ação inibitória à concentração de 5 mg.ml⁻¹ para *S. aureus* (ATCC® 25923™). Ampicilina e cloranfenicol apresentaram valores CIM compatíveis com aqueles descritos no documento M100-S24 (CLSI, 2014), validando os ensaios. A escolha por esses antibióticos teve como critério de inclusão o distinto modo de ação de cada um deles, inibição das sínteses do peptidoglicano (AMP) e proteica (CHL), que confere o efeito antibiótico dessas substâncias sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Silver, 2011). Os controles realizados descartaram quaisquer possíveis interferências nos resultados.

5.4 CONCLUSÃO

Na avaliação destes compostos quanto à sensibilidade microbiana, o método da microdiluição em caldo foi considerado apropriado por possibilitar a visualização da atividade inibitória dos extratos em pequenas concentrações. Em conclusão, os extratos de *Hyptis* tem atividade antibiótica frente as cepas testadas *S. aureus* (ATCC® 25923™), *S. aureus* (ATCC® 29213™), *E. coli* (ATCC® 10536™), *S. Cholerasuis* (ATCC® 10708™), *P. aeruginosa* (ATCC® 9027™) e *P. aeruginosa* (ATCC® 27853™) o que corrobora a utilização destas plantas na medicina tradicional.

Capítulo 6

ATIVIDADE CITOPROTETORA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE EXTRATOS DE *Hyptis* spp.

6. ATIVIDADE CITOPROTETORA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE EXTRATOS DE *Hyptis* spp.

6.1 INTRODUÇÃO

A respiração celular é fundamental para formação de moléculas de trifosfato de adenosina (ATP) capazes de gerar energia necessária ao bom funcionamento do organismo. Durante esse processo subprodutos reativos e potencialmente tóxicos, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROS) além de outros radicais livres, são gerados continuamente. Kowaltowski e Vercesi (1999), afirmam que 1 a 2% do oxigênio utilizado na respiração mitocondrial é convertido nesses subprodutos, durante a fosforilação oxidativa. Desde que não atinjam grandes níveis, estes são importantes para o desempenho de várias funções fisiológicas.

A manutenção de EROS em nível baixo é controlada por defesas antioxidantes. Todavia, quando ocorre um desequilíbrio, pode haver alta produção destas espécies que ocasionam o estresse oxidativo, e, conseqüentemente, o aumento de danos a biomoléculas (DNA, lipídios, proteínas) que quando não reparados, acabam comprometendo o funcionamento da célula e levando-a à morte por apoptose ou necrose (Barbosa *et al.*, 2006). Dessa forma, as EROS podem estar diretamente relacionadas ao desenvolvimento de várias patologias, incluindo aquelas relacionadas ao sistema nervoso (Alzheimer e Parkinson) e ao fígado (Li *et al.*, 2014; Casas-Grajales e Muriel, 2015).

Doenças relacionadas ao fígado, agudas e crônicas, frequentemente diagnosticadas em clínicas, apresentam grande preocupação no sistema de saúde mundial pelo fato deste órgão estar vinculado a maioria das vias bioquímicas associadas ao crescimento, combate a doenças, fornecimento de nutrientes e de energia e reprodução (Ward e Daly, 1999; Pandit *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2016). Além disso, este órgão metaboliza xenobióticos e moléculas endógenas garantindo a homeostase metabólica no organismo (Casas-Grajales e Muriel, 2015).

Embora a integridade do fígado seja uma condição fundamental para o bem-estar e saúde humana verifica-se que a exposição a uma variedade de drogas e contaminantes ambientais, como vírus, álcool, gordura, metabólitos biotransformados, entre outros (Lima *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2015),

tem desencadeado estresse oxidativo, indicando níveis excessivos de EROS e um desequilíbrio oxidante e antioxidante (Farzaei *et al.*, 2018). Tal situação é extremamente prejudicial as células hepáticas, incluindo hepatócitos, células de Kupffer, células estreladas e células endoteliais, por promoverem a transformação maligna danificando lipídios, proteínas e DNA e a indução da isquemia, fibrose, necrose, apoptose ou inflamação (Diesen e Kuo, 2011; Farzaei *et al.*, 2018).

A inflamação é uma resposta fisiológica de defesa do corpo a danos nos tecidos causados por infecções por patógenos microbianos, irritação química e/ou ferimentos (Yang *et al.*, 2016). Durante a inflamação, a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) é expressa em resposta a estímulos pró-inflamatórios e produz grandes quantidades de óxido nítrico (NO) por longos períodos (Hämäläinen *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2011). O NO em níveis apropriados é importante na regulação de vários processos fisiológicos, enquanto o seu excesso anormal pode levar à citotoxicidade para os tecidos do hospedeiro (Park *et al.*, 2011). Por isso, é provável que sua atuação com um agente imunoestimulador (pró-inflamatório) ou imunossupressor (anti-inflamatório) nas reações inflamatória dependa de sua concentração local, bem como de sua disponibilidade e da natureza das moléculas alvo a jusante. (Tripathi *et al.*, 2007; Predonzani *et al.*, 2015; Yuste *et al.*, 2015).

Esse papel multifacetado do NO tem sido associado à neuroinflamação e a várias doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla e doença de Alzheimer (Yuste *et al.*, 2015). A neuroinflamação pode ser iniciada por uma variedade de patógenos, como lipopolissacarídeo (LPS), β -amilóide, bactérias e vírus (Lim *et al.*, 2018). Ela é caracterizada pela ativação microglial com conseqüente aumento nos níveis de NO que induzem o estresse oxidativo e a destruição de neurônios (Cho *et al.*, 2016). Desta forma, o desenvolvimento de agentes anti-neuroinflamatórios para a inibição da ativação microglial pode ser benéfica para o tratamento de doenças associadas ao sistema nervoso (Yu *et al.*, 2018).

No intuito de amenizar danos hepáticos e distúrbios inflamatórios, drogas sintéticas foram propostas e utilizadas como medicamentos. Contudo, a intensa crítica direcionada a eles por graves efeitos colaterais (Emami *et al.*, 2007; Shal *et al.*, 2018), tem alavancado à busca de novos agentes com efeitos indesejados mínimos a partir de fontes naturais (Dharini *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2012; Shal *et al.*, 2018). Nesse intuito, fármacos provenientes de plantas medicinais que apresentem efeitos colaterais reduzidos e sejam capazes de atuar no combate a doenças hepáticas e processos inflamatórios tornam-se uma alternativa valiosa à saúde pública global.

O gênero *Hyptis*, marcado por arbustos, subarbustos e ervas perenes ou anuais com propriedades aromáticas e medicinais, é um dos maiores da família Lamiaceae com aproximadamente 400 espécies distribuídas por regiões tropicais e subtropicais (Silva-Luz *et al.*, 2012; Sakr *et al.*, 2013; Bachheti *et al.*, 2015). No Cerrado brasileiro há uma ampla diversidade morfológica de espécies com diferentes aplicações na medicina tradicional, tais como tratamento de doença de pele, distúrbios gástricos, inflamações, infecções bacterianas, dor e câncer (Bispo *et al.*, 2001; Sakr *et al.*, 2013;).

Os principais constituintes químicos de espécies *Hyptis* são da classe dos sesquiterpenos, triterpenos, diterpenos, monoterpenos, lignanas, alcaloides, flavonoides e ácidos fenólicos (Abedini *et al.*, 2013; Tonzibo *et al.*, 2009; Tafurt-Garcia *et al.*, 2015; Falcão *et al.*, 2016; Barbosa *et al.*, 2017). As *Hyptis* apresentam diferentes atividades biológicas, como antimicrobiana (De Figueirêdo *et al.*, 2018), antioxidante (Serafini *et al.*, 2017), regeneração hepática (Melo *et al.*, 2005), antidematogênica (Barbosa *et al.*, 2017), anti-inflamatória (Dos Anjos *et al.*, 2017), cicatrizante (Shenoy *et al.*, 2009), genotoxicidade (Sumitha e Thoppil *et al.*, 2016), gastroprotetora (Lima *et al.*, 2018), hepatoprotetora (Ghaffari *et al.*, 2012), neuroprotetora (Ghaffari *et al.*, 2014), antiulcerogênica (Caldas *et al.*, 2011).

Destaca-se poucos trabalhos com extratos de *Hyptis* frente às atividades biológicas que visem a mitigação de danos ao fígado. Estes relacionam-se com regeneração hepática de *H. pectinata* (Melo *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2002; Melo *et al.*, 2005; Melo *et al.*, 2006) e de *H. fruticosa* (Lima *et al.*, 2012); ação gastroprotetora de *H. crenata* em modelos *in vivo* (Lima *et al.*, 2018) e hepatoprotetora de *H. suaveolens* em modelos *in vivo* e *in vitro* (Ghaffari *et al.*, 2014). Já para atividades anti-inflamatórias destaca-se estudos *in vitro* para *H. albida* (Miranda *et al.*, 2013), *H. spicigera* (Bayala *et al.*, 2014), *H. verticillata* (Kuhnt *et al.*, 1995) e *in vivo* para *H. fruticosa* (Andrade *et al.*, 2010), *H. pectinata* (Raymundo *et al.*, 2011); *H. suaveolens* (Grassi *et al.*, 2006), *H. umbrosa* (Dos Anjos *et al.*, 2017).

Devido a destacada atividade antioxidante e aos poucos trabalhos relacionados aos efeitos citoprotetores e anti-inflamatório de *Hyptis* spp., optou-se por realizar este estudo. O objetivo foi investigar o potencial citoprotetor e anti-inflamatório das espécies *H. marrubiodes* (*Hm*), *H. pectinata* (*Hp*) e *H. suaveolens* (*Hs*). As células da linhagem hepática humana (HepG₂) foram utilizadas como modelo para averiguar o potencial citoprotetor contra danos induzidos por insultos oxidativos bem como para determinar os níveis de EROs intracelular. Segundo Lima e colaboradores (2006; 2007), as HepG₂ apresentam muitas funções especializadas típicas de hepatócitos humanos normais sendo, portanto, uma boa ferramenta para avaliar efeitos tóxicos, citoprotetores e genotóxicos/antigenotóxicos de extratos vegetais (Lima *et al.*, 2006; 2007). Já a atividade anti-inflamatória foi avaliada com uso de células

microglicais da linhagem BV2. As células BV2 são usadas há muitos anos em estudos de neuroinflamação e distúrbios neurodegenerativos por serem fáceis de cultivar e por apresentarem alta similaridade com as células microglicais primárias (Schlachetzki *et al.*, 2013; Timmerman *et al.*, 2018).

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Obtenção do material vegetal e preparação dos extratos metanólicos

As folhas de Hm, Hp e Hs coletadas no campo experimental do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiânia, Campus Rio Verde, nas coordenadas aproximadas de 17°48'3,81''S e 50°54'0,07''W; 17°48'3,94''S e 50°53'9,99''W e 17°48'3,81''S e 50°54'0,01''W, respectivamente e altitude de 727m, foram secas em estufa de circulação de ar a 35°C, trituradas em moinho de facas e acondicionadas em câmara fria a temperatura de -20°C. Os extratos metanólicos foram preparados nas mesmas condições descritas no capítulo 4 para posterior análise em ensaios com cultura de células animais.

6.2.2 Cultura de células HepG₂ e BV2

A linha celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG₂) e a linha celular microglial murina imortalizada (BV2) foi adquirida da American Type Culture Collection (ATCC) e cultivada em frascos de poliestireno com pescoço inclinado de 25 cm² (VWR, Radnor, Pennsylvania, EUA) e tampas ventiladas com filtro hidrofóbico 0,22µm, contendo meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). As culturas foram mantidas em incubadoras de CO₂ (Binder, C-150, Alemanha) a 37°C em atmosfera humidificada, contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico e os meios foram trocados a cada 2-3 dias. Após confluência, as células eram lavadas com tampão PBS, removidas dos frascos com solução de tripsina (0,25%) e contadas em microscópio óptico por meio de hemocitômetro (Fisher Scientific, EUA). A seguir,

as células eram transferidas para novos frascos ou para placas de 96 poços para desenvolvimento de ensaios.

6.2.3 Análise da viabilidade.

6.2.3.1 Ensaio MTT para determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular nos ensaios de citotoxicidade, citoproteção e atividade anti-inflamatória foi determinada pelo método colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Nestes ensaios, finalizado o tempo de incubação das células, o meio foi removido por aspiração e 180 µl um novo meio sem FBS acrescido de 20 µl de MTT (Sigma, EUA) foi adicionado a cada poço. A placa foi novamente incubada a 37°C com 5% de CO₂ por 2 horas, permitindo o metabolismo do MTT e a formação do cristal formazan visível. Após esse período, o meio com MTT foi aspirado e 200 µl de Etanol/DMSO 1:1 foi adicionado a cada poço para solubilização dos cristais de formazan sob agitação por 30 minutos e abrigo da luz. A leitura espectrofotométrica foi medida a 570 e 690 nm utilizando o leitor de microplacas SpectraMaxPlus. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade relativa às culturas de controle positivo, de acordo com a fórmula:

Ensaio de citotoxicidade/hepatoproteção

$$\text{Viabilidade celular \%} = \frac{[(Ae\ 570\text{nm} - Ae\ 690\text{nm}) - (Ab\ 570\text{nm} - Ab\ 690\text{nm})] \times 100}{(Ac\ 570\text{nm} - Ac\ 690\text{nm}) - (Am\ 570\text{nm} - Am\ 690\text{nm})}$$

Ae=absorbância da amostra, Ab=absorbância do branco da amostra,
Ac=absorbância do controle vida (células sem tratamento), Am=absorbância do meio.

6.2.3.2 Ensaios de citotoxicidade em células HepG2

Para o teste de citotoxicidade as células HepG₂ foram semeadas em placas de 96 poços (2×10⁵ células/ml) com meio completo e incubação de 20hs para promover adesão celular a placa. Posteriormente, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos Hm, Hp e Hs (500, 250, 100 e 10 µg/ml) ou DMSO 70% (para realização do controle negativo) em quadruplicado, e

incubadas por 4 e 20 hs a 37°C com 5% de CO₂. Finalizado este prazo, a viabilidade celular foi medida imediatamente conforme ensaio MTT.

6.2.3.3 Ensaio de proteção contra o estresse oxidativo induzido por agentes oxidantes em células HepG₂

O potencial de hepatoproteção dos extratos contra a formação intracelular de EROS induzida por insultos oxidativos t-BHP (terc-butil hidroperóxido) e paraquat (1,1 dimetil-4,4' bipyridílio-dicloreto) foi testado em duas diferentes condições de tratamento: co-tratamento e pré-tratamento. As concentrações não tóxicas dos extratos, evidenciadas nos ensaios de citotoxicidade foram usadas nos ensaios de citoproteção.

6.2.3.3.1 Co-tratamento de células HepG₂ com extratos e t-BHP

As células HepG₂ foram semeadas em placas de 96 poços com 200µl de meio completo a uma densidade de 2 x10⁵ células/ml e incubação de 20hs a 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram co-tratadas com 150 µl de diferentes concentrações de extratos Hm, Hp e Hs (250, 100 E 10 µg/ml) e 50 µl de t-BHP a 2mM (concentração final de 0,5mM) e incubadas por 4 horas. Finalizado este prazo, a viabilidade celular foi medida imediatamente conforme ensaio MTT.

6.2.3.3.2 Co-tratamento de células HepG₂ com extratos e paraquat

As células HepG₂ foram semeadas em placas de 96 poços com 200µl de meio completo a uma densidade de 2 x10⁵ células/ml e incubação de 20hs a 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram co-tratadas 150 µl de diferentes concentrações de extratos Hm, Hp e Hs (250, 100 E 10 µg/ml) e 50 µl de paraquat a 4mM (concentração final de 1mM) e incubadas por 4 horas. Finalizado este prazo, o meio foi aspirado. Um novo meio fresco sem FBS foi acrescentado em cada poço e a placa foi novamente incubada. Após 16 hs de incubação, determinou-se a viabilidade celular de acordo com ensaio MTT.

6.2.3.3.3 Pre-tratamento de células HepG₂ com extratos e posterior adição de t-BHP

As células HepG₂ foram semeadas em placas de 96 poços com meio completo a uma densidade de 2 x10⁵ células/ml e incubação de 20hs a 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram pré-tratadas com 150 µl de diferentes concentrações de extratos Hm, Hp e Hs (250, 100 E 10 µg/ml) e incubadas por 20 hs. Ao término deste prazo, adicionou-se 50 µl de t-BHP a 2mM (concentração final de 0,5mM) e a placa foi incubada por mais 4 horas. A seguir foi determinada a viabilidade celular de acordo com ensaio MTT.

6.2.3.3.4 Pre-tratamento de células HepG₂ com extratos e posterior adição de paraquat

As células HepG₂ foram semeadas em placas de 96 poços com meio completo a uma densidade de 2 x10⁵ células/ml e incubação de 48hs a 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram pré-tratadas com 150 µl de diferentes concentrações de extratos Hm, Hp e Hs (250, 100 E 10 µg/ml) e incubadas por 2 hs. Ao término deste prazo, adicionou-se 50 µl de paraquat a 4mM (concentração final de 1mM) e a placa foi incubada por mais 3 horas. A seguir, o meio foi aspirado. Um novo meio fresco sem FBS foi acrescentado em cada poço e a placa foi novamente incubada. Após 16 hs de incubação, determinou-se a viabilidade celular segundo o ensaio MTT.

6.2.3.4 Ensaio para determinação do EROs intracelular

A determinação dos níveis de EROS intracelular foi avaliada pelo método do 2,7 dicloro-fluoresceína diacetato (DCFH-DA). As células HepG₂ foram cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2 x 10⁵ células/ml por 20 horas em estufa 37°C. A cada poço contendo 200µl de meio com células, adicionou-se 50µl de DCFH-DA 25µM (Sigma-Aldrich). As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C com 5% de CO₂ no escuro. Após o período de incubação, o DCFH-DA foi aspirado e adicionou-se PBS. A fluorescência foi medida imediatamente. A seguir, adicionou-se 150µl de extrato em várias concentrações em meio sem FBS e incubou-se por mais 2 hs. Após esse período, 50 µl de t-BHP a 2 mM (concentração final 0,5mM) foi adicionado aos poços (co-tratamento com extratos) e incubado por mais 3 hs no escuro. Finalizado este período, a intensidade da fluorescência foi medida e detectada com comprimento de onda de emissão a 535 nm e comprimento de onda de excitação a 488 nm usando o leitor fluorômetro e luminômetro de microplacas Fluoroskan Ascent™ FL.

6.2.3.5 Ensaio para determinação da atividade anti-inflamatória pela produção de óxido nítrico (NO)

A atividade anti-inflamatória dos extratos metanólicos de *Hyptis* spp. foi determinada na linha celular BV2 (microglia de ratinho) pela produção de NO estimado mediante a acumulação de nitritos nos sobrenadantes das culturas celulares.

A quantidade de 1ml de suspensão celular a concentração de $1,5 \times 10^5$ células/ml foi semeada em placas de 12 poços a uma densidade de 1×10^5 cels/ml e incubadas por 20hs a 37°C com 5% de CO₂. Após esse período, retirou-se o meio e adicionou-se 150µl de extratos em diferentes concentrações em meio com FBS2%. As placas foram incubadas por mais 2 hs. A seguir, as células foram ativadas (induzidas à inflamação) com 50µl de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* a 4µg/ml (LPS, concentração final de 1µg/ml) em meio com FBS 2% e as placas foram incubadas por 20 horas.

Finalizado o prazo de incubação, o sobrenadante da cultura celular foi retirado para quantificação de nitritos pela reação colorimétrica de Griess. Colocou-se 50µl do sobrenadante em placas de 96 poços e adicionou-se 50µl do reagente A (sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5%) e deixou-se a placa em repouso por 10 minutos no escuro e a temperatura ambiente. Ao fim desse tempo, adicionou-se 50µl do reagente B (naftildetilenodiamina a 0,1%) e deixou-se em repouso por mais 10 minutos no escuro e a temperatura ambiente. A absorvência foi lida a 543 nm no leitor de microplacas Synergy-4. A viabilidade celular também foi determinada pelo ensaio de redução do MTT visando verificar se houve morte celular significativa durante o ensaio de indução da inflamação.

6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas utilizando o software Graph Pad Prism® versão 5.01 (San Diego, CA). Os dados foram apresentados como média ± E.P.M. (Erro Padrão da Média) de três experimentos independentes realizados em quadruplicata. A significância das diferenças entre as médias obtidas foram avaliadas usando ANOVA one-way com o teste de comparação múltipla de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$ para todas as análises.

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.4.1. Ensaios de citotoxicidade em células HepG₂

Atualmente, sabe-se que as EROs estão diretamente relacionadas a uma série de patologias humanas, incluindo aquelas que ocasionam distúrbios neurodegenerativos e processos deletérios no fígado. Várias drogas sintéticas foram criadas e empregadas no intuito de amenizar esses problemas. Todavia, seus efeitos tóxicos foram alvos de muita crítica e, também, um dos principais responsáveis pelo crescimento de estudos ligados ao potencial de plantas medicinais como fármacos que atuam no combate de doenças complexas do sistema hepático e nervoso.

Diante do exposto, destaca-se que a pré-triagem por testes *in vitro* com células animais tem sido muito aplicado para ensaios de citotoxicidade dos extratos vegetais. Conforme as diretrizes e recomendações do programa de triagem de plantas estabelecidas pelo Instituto Nacional do Câncer dos EUA (NCI), um extrato bruto pode ser considerado citotóxico se ele inibe 50% do crescimento celular (IC₅₀) a concentrações iguais ou menores que 20 µg/mL, após um tempo de incubação de 72 horas (Vijayarathna e Sasidharan, 2012; Sufian *et al.*, 2013; Kuete *et al.*, 2013; Maqsood *et al.*, 2018).

Os testes de citotoxicidade na linha celular HepG₂ tratadas com diferentes concentrações dos extratos Hm, Hp e Hs (Figura 6.1) avaliaram a toxicidade dos extratos, visto que há poucos estudos sobre essas plantas. Com 4hs de incubação, os extratos de Hm e Hp (250, 100 e 10 µg/ml) e Hs (500, 250, 100 e 10 µg/ml) resultaram em viabilidade celular superior a 95%. Já com 24hs de incubação, as concentrações de 100 e 10 µg/ml, para todos os extratos, apresentaram viabilidade celular acima de 93%. No entanto, doses iguais ou superiores a 250 µg/ml mostraram-se tóxicas as células com 24hs. Destaca-se que a citotoxicidade observada em todos os casos foi dependente da dose, com exceção de Hs 4hs em que a viabilidade celular não foi afetada por nenhuma das concentrações testadas.

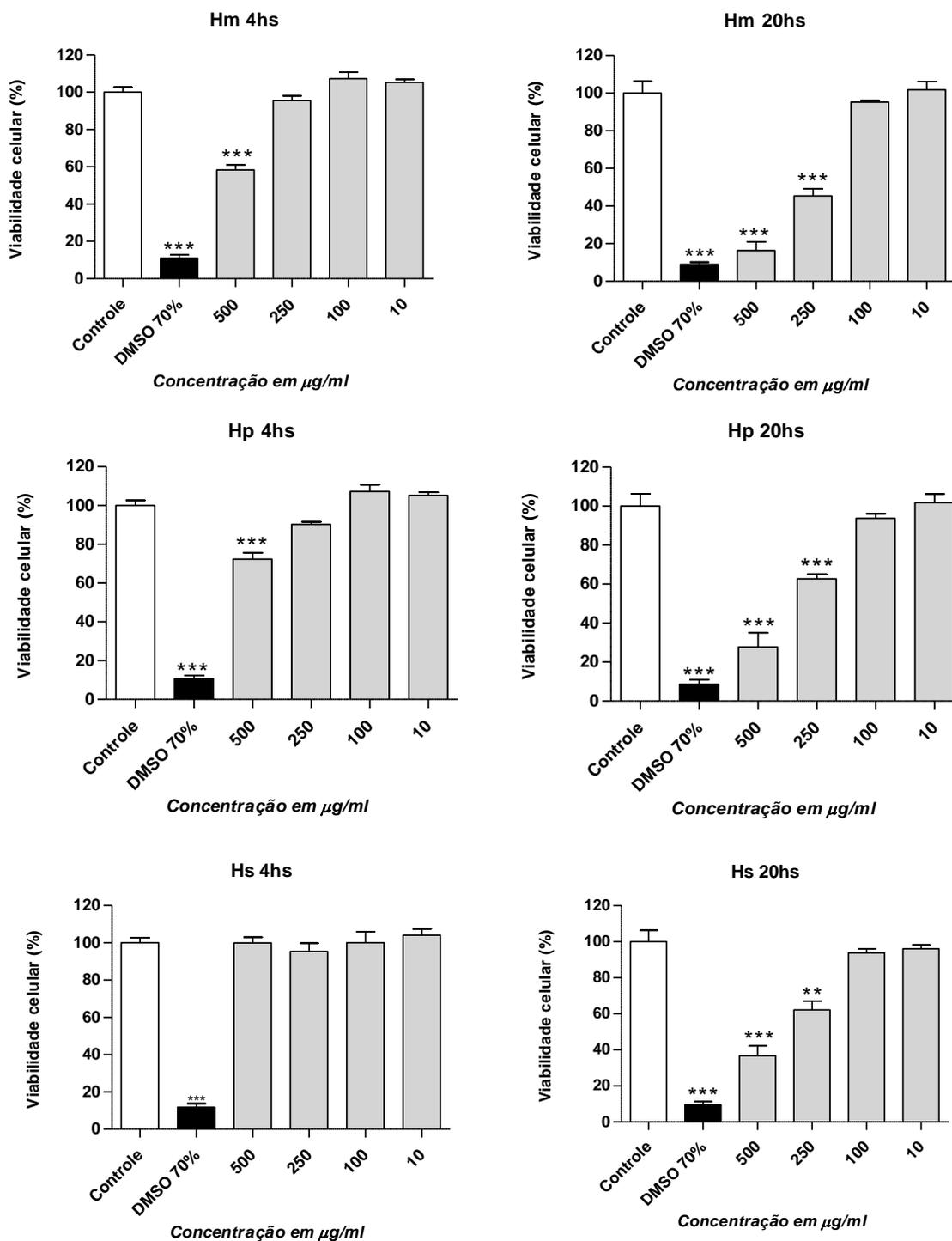


Figura 6.1 – Citotoxicidade de diferentes concentrações de extratos de Hm, Hp e Hs (500, 250, 100 E 10 µg/ml) na linha celular HepG₂. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT após 4 ou 24 hs de incubação. A viabilidade do grupo controle (células + meio, não tratadas) foi considerada como 100%. Todos os valores foram comparados com o grupo controle. Cada coluna representa a média ± E.P.M considerando os resultados obtidos para três experimentos independentes realizados em quadruplicata. A diferença significativa nas médias foi estabelecida em * P<0.05, ** P<0.01 e *** P<0.001, quando comparado com o controle

Situação semelhante aos resultados apresentados ocorreu para o óleo essencial de *H. martiusii* que na concentração de 263,12 µg/ml passou a exibir efeito citotóxico frente aos fibroblastos de mamíferos ATCC CCL-1 (De Figueirêdo *et al.*, 2018). Em relação a Hp, Barbosa e colaboradores (2012) não verificaram citotoxicidade do extrato hidroetanólico (50µg/ml) em células monocleares do sangue periférico, mas observaram ação moderada em células MDA-MB435 (câncer de mama humano), HCT-8 (câncer do cólon humano), SF-295 (glioblastoma humano) e HL-60 (leucemia). Assim como Hp, o extrato etanólico de *H. martiusii* também demonstrou toxicidade moderada, usando 10 e 100µg/ml, em macrófagos J774 e, por ter apresentado atividade antieipimastigota e antifúngica, tornou-se uma alternativa interessante nos esforços para combater doenças infecciosas como candidíase e doença de Chagas (Santos *et al.*, 2013). Em outro estudo, os óleos essenciais de *H. sidifolia* (IC₅₀=31,2), *H. suaveolens* (IC₅₀=50,4), *H. mutabilis* (IC₅₀=55,2) não foram citotóxicos nas células renais de macacos verdes africanos (Vero ATCC CCL-81) (Zapata *et al.*, 2009).

Contudo, há de se relatar estudos sobre a propriedade anticâncer das espécies *Hyptis* onde a citotoxicidade foi significativa. Entre estes destaca-se *H. martiusii* contra células tumorais B16 (pele murina), HCT-8 (côlon humano), MCF-7 (mama humana) e CEM e HL-60 (leucemias humanas) (Cruz *et al.*, 2006); *H. verticillata* contra HT 29 (carcinoma do cólon), KB (carcinoma epidermóide) (Kuhnt *et al.*, 1995) e S1T (leucemia de células T adulta) (Hamada *et al.*, 2012); compostos mentol e linalol isolados de *H. suaveolens* contra MCF-7 (câncer da mama humana) (Deepika *et al.*, 2013).

Quanto a toxicidade *in vivo*, extratos aquosos de *H. fruticosa*, não apresentaram toxicidade quando administrados oralmente em camundongos nas doses de 1,3 a 5g/kg (Silva *et al.*, 2006) assim como seu óleo essencial aplicado subcutaneamente na dose de 5g/kg (Menezes *et al.*, 2007). Os óleos essenciais de *H. rhomboidea*, *H. brevipe* e *H. suaveolens* mostraram toxicidades em bioensaios com camarão (Xu *et al.*, 2013) ao contrário da infusão de folhas de *H. suaveolens* em bioensaios com *Artemia salina* e *Drosophila melanogaster* (Bezerra *et al.*, 2017).

Além destes, destaca-se um estudo envolvendo os extratos metanólicos das espécies Hm, Hp e Hs para investigar efeitos toxicológicos no modelo *in vivo* *Caenorhabditis elegans*. Neste estudo, os extratos não foram considerados tóxicos ao *C. elegans* para concentrações de até 1mg/ml (Campos, 2018). Embora as concentrações tóxicas determinadas *in vivo* não tenham sido equivalentes as concentrações tóxicas do ensaio de citotoxicidade *in vitro*, ambos os ensaios ressaltaram a não toxicidade dos extratos para o modelo aplicado indicando que estes apresentam potencial para avaliação como medicamentos.

6.4.2 Ensaio de proteção contra o estresse oxidativo induzido por agentes oxidantes em células HepG₂

O potencial efeito citoprotetor dos extratos vegetais contra o estresse oxidativo induzido por t-BHP ou paraquat foi avaliado em dois diferentes tipos de tratamento para explicar possíveis diferenças nos mecanismos de proteção: pré-tratamento e co-tratamento.

O t-BHP é um análogo reativo de cadeia curta de hidroperóxidos lipídicos cuja toxicidade nas células HepG₂ como indutor da formação de EROs e do estresse oxidativo tem sido cada vez mais empregada como modelo para investigar a citoproteção de produtos naturais (Akanitapichat *et al.* 2010; Xie *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2016; Rubio *et al.*, 2017). Já o paraquat é um herbicida altamente tóxico para humanos que, em virtude sua reprodutividade e simplicidade de administração, tem sido amplamente utilizado como modelo experimental em estudos *in vitro* e *in vivo* sobre estresse oxidativo mediado por EROs (Bauman *et al.*, 1992; Ranjbar, 2014; Novaes *et al.*, 2016; Vaccari *et al.*, 2017).

As concentrações de extratos (10 µg/ml, 100 µg/ml e 250 µg/ml) que não mostraram toxicidade significativa após 4 h de incubação, foram testadas. As porcentagens de viabilidade celular obtidas foram comparadas com o controle com t-BHP ou controle com paraquat no intuito de verificar se os extratos de Hm, Hp e Hs seriam ou não capazes de prevenir o dano oxidativo promovido pelo t-BHP ou paraquat.

No co-tratamento, em que as células HepG₂ foram tratadas concomitantemente com o agente tóxico t-BHP e com diferentes concentrações do extrato por 4 hs (Figura 6.2) verificou-se que os extratos de Hm não impediram a diminuição significativa da viabilidade celular. Já os extratos de Hs e Hp (100 e 250 µg/ml) apresentaram a diminuição da morte celular de maneira significativa. No co-tratamento, em que as células HepG₂ foram tratadas concomitantemente com o paraquat e com diferentes concentrações do extrato por 4hs, não houve efeito citoprotetor em nenhuma das concentrações testadas para os extratos de Hp (figura 6.3). Os extratos de Hs a 100 µg/ml impediram a diminuição da viabilidade celular de forma significativa. Já os extratos de Hm mostraram-se significativos para as concentrações 250 µg/ml e 100 µg/ml. Tanto Hs quanto Hm mostraram melhor atividade citoprotetora para concentração de 100 µg/ml.

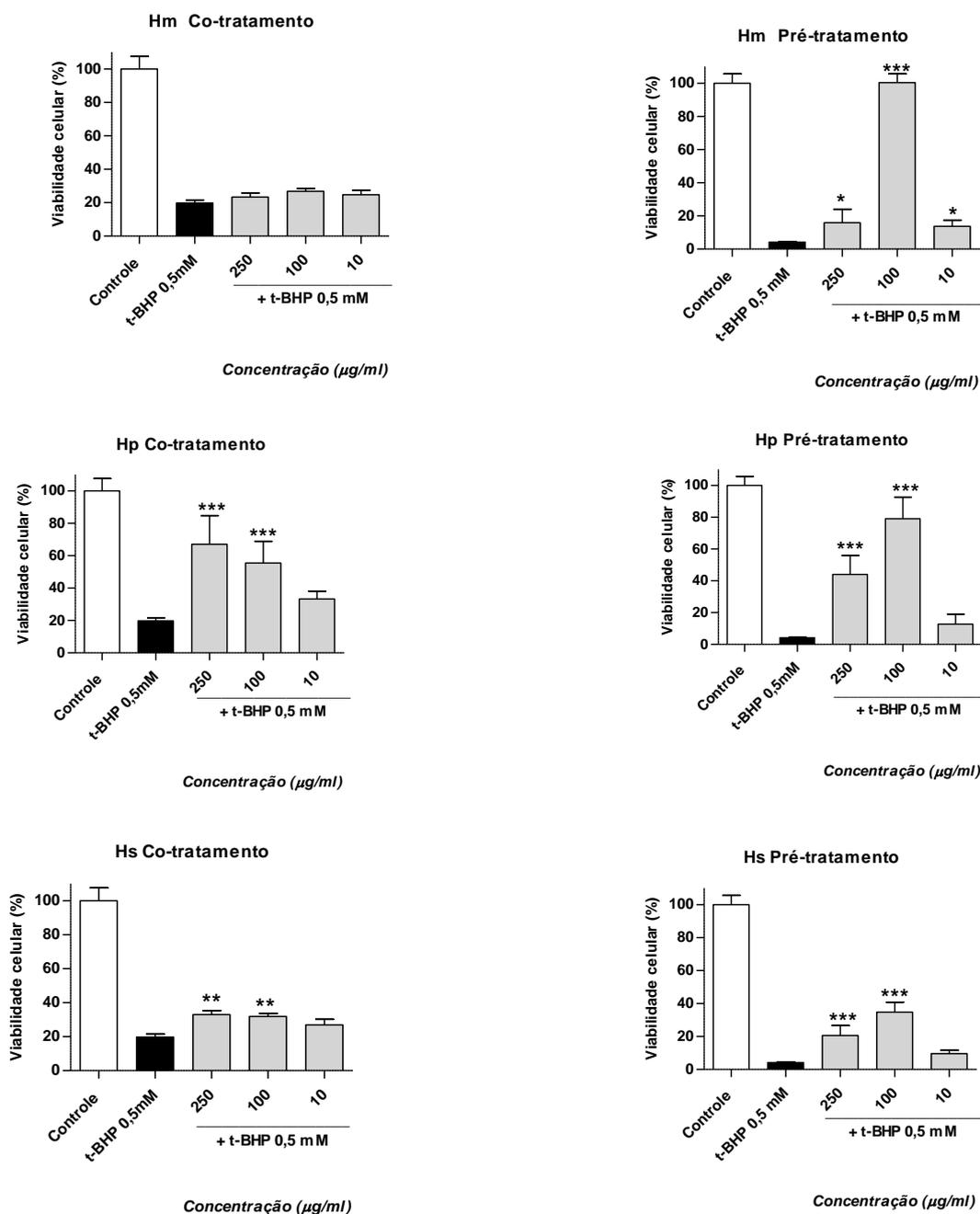


Figura 6.2 – Citoproteção de diferentes concentrações de extratos de Hm, Hp e Hs (500, 250, 100 E 10 µg/ml) na linha celular HepG₂. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT após o co-tratamento (células co-tratadas com extratos+ t-BHP 0,5mM) e após o pré-tratamento (células pre-tratadas com extratos por 20 hs com posterior adição de t-BHP 0,5mM). A viabilidade do grupo controle negativo (células+meio, não tratadas) foi considerada como 100%. Todos os valores foram comparados com o grupo controle com t-BHP 0,5mM. Cada coluna representa a média \pm E.P.M considerando os resultados obtidos para três experimentos independentes realizados em quadruplicado. A diferença significativa nas médias foi estabelecida em * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$, quando comparado com o controle com t-BHP 0,5mM.

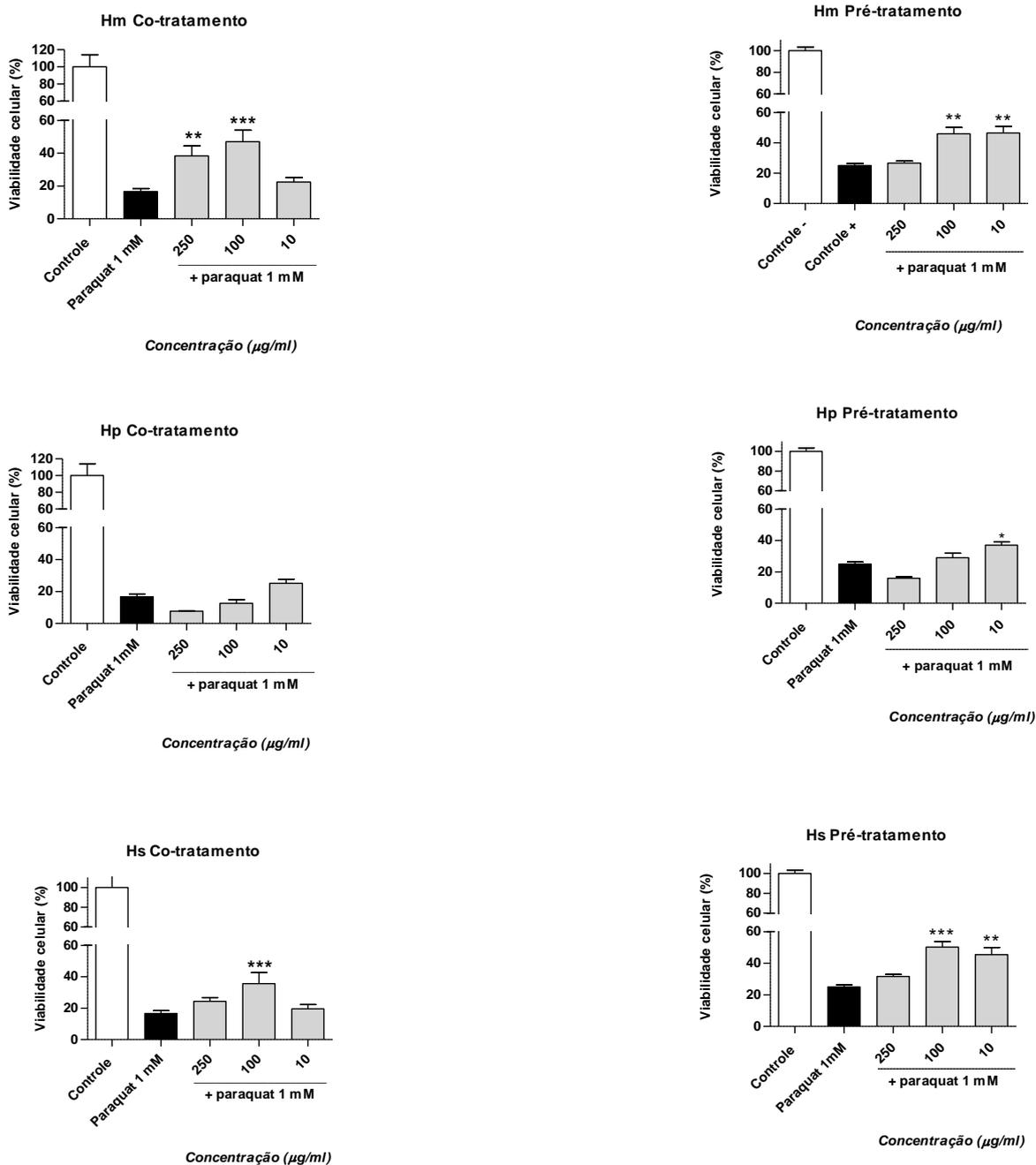


Figura 6.3 – Citoproteção de diferentes concentrações de extratos de Hm, Hp e Hs (500, 250, 100 e 10 µg/ml) na linha celular HepG₂. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT após o co-tratamento (células co-tratadas com extratos + paraquat a 1mM) e após o pré-tratamento (células pre-tratadas com extratos por 2 hs com posterior adição de paraquat a 1mM). A viabilidade do grupo controle negativo (células+meio, não tratadas) foi considerada como 100%. Todos os valores foram comparados com o grupo controle paraquat a 1mM. Cada coluna representa a média ± E.P.M considerando os resultados obtidos para três experimentos independentes e realizados em quadruplicado. A diferença significativa nas médias foi estabelecida em * P<0.05, ** P<0.01 e *** P<0.001, quando comparado com o controle paraquat a 1mM.

Lima e colaboradores (2007) avaliaram os potenciais efeitos citoprotetores de extratos aquoso e metanólico de sálvia (*Salvia officinalis*, Lamiaceae) contra morte celular induzida por t-BHP em células HepG2 e segundo eles, o extrato metanólico, com maior teor de compostos fenólicos, tais como ácido rosmarínico e luteolina-7-glucosídeo, conferiu melhor proteção nas células hepáticas do que o extrato aquoso.

No pré-tratamento em que as células foram tratadas primeiramente com extrato por 20hs e, posteriormente, pelo estressor t-BHP durante 4hs, houve citoproteção significativa para Hm, Hp e Hs (250 e 100 µg/ml). A concentração de 100 µg/ml garantiu os melhores resultados para as três espécies *Hyptis*. No pré-tratamento em que as células foram tratadas primeiramente com extrato por 2hs e, posteriormente, pelo estressor paraquat durante 3hs, houve citoproteção significativa para Hm e Hs (100 e 10µg/ml) e Hp (10µg/ml).

Essa propriedade citoprotetora também foi confirmada por Ghaffari e colaboradores (2012). Segundo eles, o pré-tratamento com 0,7 mg/ml de extrato metanólico de Hs inibiu significativamente a citotoxicidade induzida por H₂O₂ em células HepG2. Em outro estudo, o pré-tratamento de células de neuroblastoma N2A com 2 mg/ml de extrato metanólico de Hs neutralizou completamente o estresse induzido por H₂O₂ demonstrando sua eficácia em prevenir o estresse oxidativo das células (Ghaffari *et al.*, 2014). Neste mesmo trabalho, também foi constatado que o extrato metanólico de Hs atua como hepatoprotetor ao proteger ratos contra hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄). Babalola e colaboradores (2011) confirmaram a possível atividade hepatoprotetora do pré-tratamento com extrato aquoso das folhas de Hs sobre hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em coelhos.

Outros modelos *in vivo* foram usados para avaliar a ação protetora de *Hyptis*. Verificou-se que os extratos Hm, Hp e Hs a concentração de 1mg/ml testados nos animais *C.elegans* N2, Ck10 e AT3q130 se mostraram capazes de proteger os animais do dano oxidativo induzido pela exposição a juglona, indicando uma possível ação antioxidante com efeitos neuroprotetores. Esses resultados condizem com os ensaios realizados em HepG₂ quanto à não toxicidade, poder antioxidante e ação protetora. Em outros estudos, os óleos essenciais de *H.crenata*, *H. martiusi*, *H.spicigera* tiveram potencial de gastroproteção confirmados quando aplicados em roedores. Tanto óleos quanto extratos de Hs tiveram a gastroproteção confirmada em roedores.

Por fim, podemos dizer que o estudo com extratos Hm, Hp e Hs podem ser propostos para proteger o fígado contra danos oxidativos ocasionados por diferentes estressores e que os efeitos

hepatoprotetores e citoprotetores podem estar correlacionados com seus efeitos antioxidantes e de remoção de radicais livres (Ghaffari *et al.*, 2014).

6.4.3 Ensaio para determinação do EROs intracelular

No intuito de verificar se os efeitos citoprotetores observados em plantas *Hyptis* podem ser atribuídos a uma redução no estresse oxidativo, determinamos os efeitos dos extratos na geração de EROs em células HepG2 expostas a t-BHP 2mM (concentração final 0,5mM). Quando as células foram expostas ao t-BHP, estas sofreram uma modificação no seu estado redox com consequente geração de EROs que foram monitorados a partir do uso do indicador de fluorescência DCFH-DA. A DCFH-DA entra nas células e se acumula principalmente no citosol onde sofre desacetilação por esterases citosólicas sendo convertida em diclorofluorescina (DCFH, produto não fluorescente) (Halliwell e Whiteman, 2004). Na presença de espécies reativas é reduzida a diclorofluoresceína (DCF) que possui característica fluorescente, facilmente observável (Halliwell e Whiteman, 2004). Para a interpretação dos resultados, o nível de espécies reativas geradas pela ação do t-BHP foi considerado diretamente proporcional à intensidade de fluorescência detectada pelo fluorímetro.

Conforme a figura 6.4, no pré-tratamento de células HepG2 com os extratos de *Hyptis* na concentração de 100µg/ml e, posterior adição do estressor t-BHP, houve uma inibição significativa da geração de EROs com consequente proteção das células. Estes resultados demonstram que os extratos de *Hyptis* atuam como eliminadores de EROs induzidos por t-BHP em células HepG2.

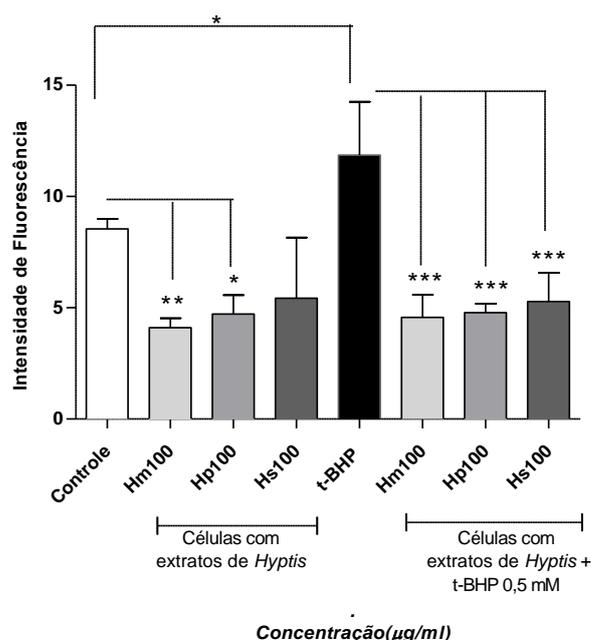


Figura 6.4 – Produção de EROs após pré-tratamento (células pre-tratadas com extratos de Hm, Hp e Hs a 100 μ g/ml por 20 hs com posterior adição de t-BHP a 0,5mM) na linha celular HepG₂. A viabilidade do grupo controle negativo (células não tratadas) foi considerada como 100% e utilizada para comparação com células tratadas somente com extratos de *Hyptis*. Já o controle com t-BHP a 0,5 mM foi comparado com as células tratadas com extrato de *Hyptis* e t-BHP. Cada coluna representa a média \pm E.P.M considerando os resultados obtidos para três experimentos independentes e realizados em quadruplicado. A diferença significativa nas médias foi estabelecida em * P<0.05, ** P<0.01 e *** P<0.001, quando comparado com os controles.

Trabalhos anteriores, mostram que culturas de células N2A pré-tratadas com extratos metanólico de Hs e expostas posteriormente ao H₂O₂ para ocasionar o estresse oxidativo e neurotoxicidade, também exibiram menores quantidades de EROs intracelular (Ghaffari *et al.*, 2014). Yoon e colaboradores (2014) afirmam que a redução significativa da geração de EROS em pré-tratamentos de células HepG2 com 200 μ g/mL de extrato metanólico de arroz preto expostas a t-BHP poder estar ligada a presença de compostos fenólicos como cianidina-3-glicosídeo e peonidina-3-glicosídeo contidas no extrato de arroz preto, bem como, de outros compostos fenólicos com efeitos antioxidantes. Kong e colaboradores (2016) relataram a capacidade dos extratos aquosos de *Barringtonia racemosa* em suprimir a produção de EROs, em células HepG2 após a indução de dano oxidativo por H₂O₂, de forma semelhante às células não tratadas com o extrato. Segundo eles, a ação antioxidante revelada pelo teste FRAP poderia ter protegido as células contra os danos oxidativos. Tal situação também pode ser constatada neste estudo evidenciando ainda mais os resultados aqui apresentados.

6.4.4 Ensaio para determinação da atividade anti-inflamatória pela produção de óxido nítrico (NO)

O efeito supressor dos diferentes extratos de *Hyptis* na produção de NO, foram analisados por meio da reação de Griess no sobrenadante de culturas celulares BV2 estimuladas por LPS. O LPS compõe a parede celular das bactérias Gram negativas (Nicholas *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010; Raza *et al.*, 2016) e funciona como um estímulo inflamatório capaz de induzir a expressão da enzima iNOS (óxido nítrico-sintase induzida) em uma variedade de tipos de células (Spitzer *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005; Lechner *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2017; Chu *et al.*, 2017) dentre as quais destaca-se as células microgliais da linhagem BV2 (Cho *et al.*, 2016; Lim *et al.*, 2018). A iNOS, uma vez, expressa em células BV2 ativadas, pode gerar a partir da L-arginina, grandes quantidades de mediadores inflamatórios como NO por longos períodos (Saha e Pahan, 2006a, 2006b; Kim *et al.*, 2005; Lechner *et al.*, 2005). Níveis normais de NO podem atuar como neuromoduladores nas junções sinápticas, todavia, altos níveis secretados pela microglia ativada induzem estresse oxidativo e destruição de neurônios, contribuindo para distúrbios neurodegenerativos (Cho *et al.*, 2016). Portanto, a supressão da produção de NO por algum composto ativo indica um potencial papel anti-inflamatório (Henrique e Sampaio, 2002).

Na figura 6.5, verificamos que as células microgliais BV2 tratadas com LPS produziam 3,9 vezes mais NO que as células não tratadas com LPS. No entanto, os extratos de Hm, Hp e Hs, na concentração de 100 µg/ml, diminuiriam significativamente a produção de NO nas células BV2 estimuladas por LPS quando comparadas com o controle sem extrato e com LPS. Houve uma diminuição significativa da viabilidade celular para Hm, determinada pelo ensaio MTT (figura 6.6) enquanto que para Hp e Hs não houve morte celular considerável. Estes resultados demonstram que os extratos de Hp e Hs apresentaram potencial anti-inflamatória em células BV2 estimuladas por LPS, inibindo a produção de NO.

Outros trabalhos destacam o potencial anti-inflamatório de algumas espécies de *Hyptis* em ensaios *in vitro*. O extrato de clorofórmio de *H. albida*, composto por terpenos, flavonóides, lactonas, lignanas, derivados fenólicos e esteroides apresentou atividade anti-inflamatória significativa observada no ensaio *in vitro* com macrófagos peritoneais (Miranda *et al.*, 2013). Os autores acreditam que essa atividade se deva à ação sinérgica de muitos destes componentes. As propriedades anti-inflamatórias do óleo essencial de *H. spicigera* foram exibidas pela inibição da atividade da lipoxigenase em linhas celulares de câncer de próstata humano (Bayala *et al.*, 2014). Em teste HET-CAM com ovos de galinha,

o composto isolado, ácido rosmarínico, demonstrou efeitos estabilizadores nos capilares enquanto que a sideritoflavona inibiu a prostaglandina sintase (Kuhnt *et al.*, 1995).

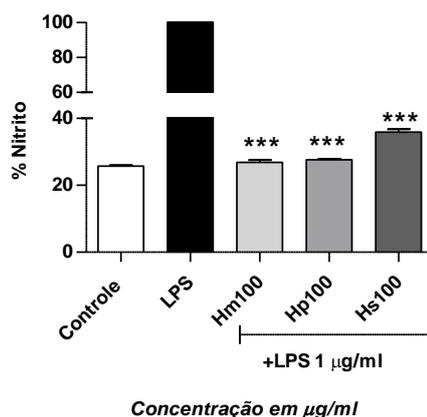


Figura 6.5 – Produção de NO. Células BV2 semeadas em placas de 12 poços foram tratadas com extratos de *Hyptis* spp. a 100µg/ml por 2hs seguida por estimulação com LPS por 20hs. O sobrenadante foi retirado para a medição do NO₂ pela reação colorimétrica de Griess. O controle negativo representa a % de produção de nitrito das células sem tratamento e o controle com LPS representa a % de produção de nitrito das células com LPS sendo usado para comparação com os demais valores. Cada coluna representa a média ± E.P.M considerando os resultados obtidos para três experimentos independentes. A diferença significativa nas médias foi estabelecida em * P<0.05, ** P<0.01 e *** P<0.001, quando comparado com o controle com LPS.

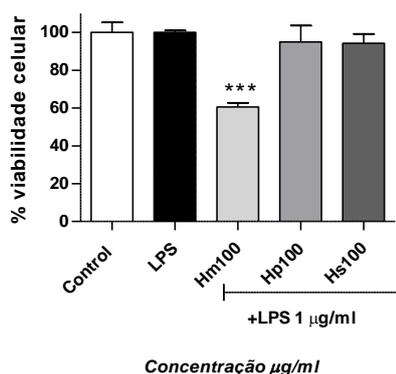


Figura 6.6 – Viabilidade celular das células BV2 estimuladas por LPS e tratadas com extratos de *Hyptis* spp. Células BV2 semeadas em placas de 12 poços foram tratadas com extratos de *Hyptis* spp. por 2hs seguida por estimulação com LPS por 20hs. O sobrenadante foi retirado para a medição do NO₂ e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução do MTT. Cada coluna representa a média ± E.P.M considerando os resultados obtidos para três experimentos independentes. A diferença significativa nas médias foi estabelecida em * P<0.05, ** P<0.01 e *** P<0.001, quando comparado com o controle com LPS.

Em ensaios *in vivo* utilizando ratos, também verificamos bons resultados anti-inflamatórios para extrato etanólico de *H. fruticosa* (Andrade *et al.*, 2010) e *H. umbrosa* (Dos Anjos *et al.*, 2017), óleo

essencial de *H. pectinata* (Raymundo *et al.*, 2011), compostos isolados de *H. suaveolens* (Grassi *et al.*, 2006).

Estudos anteriores mostraram uma estreita associação entre o potencial antioxidante e anti-inflamatório com a presença de compostos fenólicos. É o caso do extrato de fruta de *Terminalia chebula* que foi capaz reduzir a produção de NO e a taxa de mortalidade de células da microglia estimuladas pelo LPS (Gaire *et al.*, 2013). Em outro estudo destaca-se que as antocianinas (polifenóis) de cascas de sementes de soja preta fornecem efeito benéfico no tratamento de danos inflamatórios e neurodegenerativos induzidos por ativação microglial (Jeong *et al.*, 2013). Chansiw e colaboradores (2019) mostraram que os extratos de diclorometano contendo compostos fenólicos e flavonóides, além de outros agentes anti-inflamatórios não identificados, apresentaram uma alta redução da produção de óxido nítrico em células de macrófagos RAW 264.7 induzidas por LPS (Chansiw *et al.*, 2019). Já Lee e colaboradores (2017), sugerem que *Scutellaria barbata* e os compostos isolados (flavonóide e diterpenóides) inibiram a produção de NO em BV2 e têm potencial para investigação adicional, não apenas como agente anti-inflamatório, mas também como agente anti-neuroinflamatório. Outro estudo diz que extratos etanólico e de acetato de etila contendo flavonoides, ácidos fenólicos, clorofilas e carotenoides apresentaram ação anti-inflamatória em relação às células RAW 264.7 e podem ser usados como agente anti-inflamatório para possíveis aplicações médicas (Liu *et al.*, 2018).

Diante dos resultados apresentados e das informações buscadas na literatura, supõem-se que o potencial anti-inflamatório de Hp e Hs diagnosticados neste ensaio pode ter relação com seus compostos fenólicos e outros não identificados.

6.5 CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados indicam efeitos não citotóxicos e ação antioxidante, citoprotetora e anti-inflamatória dos extratos metanólicos de Hm, Hp e Hs. A presença de compostos fenólicos, tais como ácido rosmarínico, pode estar associada à proteção contra o estresse oxidativo, ao neutralizar as EROs e outros tipos de radicais livres, exibindo assim seu potencial terapêutico. Portanto, este estudo fornece amparo para uso de plantas medicinais no tratamento de doenças hepáticas e inflamações.

Capítulo 7

CONCLUSÕES FINAIS

7. CONCLUSÕES FINAIS

As plantas, sob estresse biótico e abiótico, geram um amplo espectro de moléculas orgânicas conhecidas como metabólitos secundários. Estes compostos mostraram ser fonte de substâncias químicas de diversas estruturas com promissoras atividades biológicas e, portanto, fonte de agentes terapêuticos importantes para o tratamento ou prevenção de diversas doenças (Jantan *et al.*, 2015). O potencial bioativo de plantas vem instigando investigações adicionais sobre os metabólitos secundários para produção de novos fitomedicamentos.

No intuito de contribuir com a descoberta de novos fitomedicamentos oriundos da biodiversidade brasileira selecionaram-se plantas medicinais pertencentes à família *Lamiaceae* para desenvolvimento dos estudos desta Tese. Esta família, rica em espécies medicinais e aromáticas, é composta por 236 gêneros, dos quais priorizou-se o gênero *Hyptis* por sua possibilidade de exploração econômica, pelo potencial farmacológico de seus extratos e óleos essenciais e pela existência de poucos estudos que avaliem sua atividade biológica.

A revisão sistemática realizada neste trabalho (capítulo 2) sobre este gênero apontou que das 400 espécies existentes, apenas 40 foram avaliadas cientificamente. Há um total de 238 artigos devidamente publicados sobre este gênero e destes, 101 abordam sobre a espécie *Hyptis suaveolens* (Hs), considerada a mais estudada, 30 sobre *Hyptis pectinata* (Hp) e 10 sobre *Hyptis marrubioides* (Hm). Muitas destas plantas ainda precisam ser exploradas quanto ao perfil fitoquímico, atividades farmacológicas e efeitos toxicológicos no corpo humano para estabelecimento de critérios para uso seguro no organismo humano. Conforme a literatura, os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* ou *in vivo* associam a atividade biológica dos compostos de *Hyptis* spp. com a presença de determinado composto isolado ou ação de sinergismo dos fenólicos. Também, verificou-se em alguns trabalhos que os resultados alcançados concordavam com o conhecimento popular.

Em face dos usos na medicina popular e dos poucos registros científicos para as espécies Hm, Hp e Hs, prosseguimos os estudos abordando as técnicas de cultura *in vitro* como uma alternativa viável à síntese de metabólitos secundários visto que o cultivo de plantas em campo possui várias desvantagens (capítulo 3). Plântulas foram utilizadas como explantes para formação de calos e como biomassa para produção de extratos metanólicos. Os calos foram utilizados no estabelecimento de culturas em suspensão. Destas últimas, obteve-se a curva de crescimento das culturas com identificação das suas fases de desenvolvimento. Por meio da curva de crescimento das culturas foi possível conhecer a época

ideal para repicagem das culturas e definir o momento para promover as eliciações visando aumento da síntese de AR. Composto este que possui valiosa importância farmacêutica, como antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, anti-alérgica, antidepressivas, antimicrobiana e anti-Alzheimer. Os tratamentos de Hs com MeJ e Hm com MeJ e AS demonstraram um significativo aumento de AR quando comparados ao controle. Contudo, este aumento foi proporcional a diminuição da viabilidade celular o que requer mais estudo para aprimoramento da técnica.

A presença de ácidos fenólicos da classe dos ácidos hidroxicinâmicos, nos extratos *in vivo* e *in vitro* foi confirmada por espectrometria, bem como a presença de flavonóis e flavonas (capítulo 4). Entre os compostos identificados têm-se os derivados do ácido rosmarínico, quercetina, ácido clorogênico, luteolina. O registro fitoquímico da presença de ácidos fenólicos e flavonóides, tidos como poderosos antioxidantes que tratam ou previnem muitas doenças, incluindo doenças do fígado e neurodegenerativas, motivaram o desenvolvimento de ensaios antioxidantes para extratos metanólicos de amostras *in vitro* e amostras *in vivo*. Foram realizados ensaios DPPH, quelação de ferro, quelação de NO, β -betacaroteno, superóxido e FRAP. Em todos os ensaios, com exceção do superóxido e FRAP, a substância padrão quercetina, apresentou os melhores resultados quanto a determinação da capacidade antioxidante. Os extratos atingiram EC_{50} a diferentes concentrações em todos os ensaios (exceto, os extratos Hs *vivo* e *in vitro* no ensaio de quelação de NO, cujo EC_{50} não foi determinado) e, portanto, apresentaram propriedades antioxidante para as diferentes metodologias utilizadas. Todavia, diante dos distintos resultados alcançados para cada extrato, não há como se afirmar que a atividade antioxidante está correlacionada com a quantidade de fenólicos presentes. Segundo Sroka e Cisowski (2003) a eficiência dos compostos fenólicos como anti-radicais e antioxidantes é variada e depende de vários fatores, tais como o número, a posição da ligação e a posição do(s) grupo(s) hidroxila no anel aromático. Somado a isso, tem-se o efeito sinérgico ou antagônico de compostos presentes no extrato bruto (Benabdallah et al., 2016).

Os compostos fenólicos também são tidos como potentes antimicrobianos e, por isso, testaram-se 08 cepas bacterianas quanto à sensibilidade aos extratos de *Hyptis* (capítulo 5). As cepas de *S.aureus* (Gram-positivas) apresentaram maior sensibilidade aos extratos metanólicos de Hs, Hp e ao extrato de acetato de etila de Hp. O extrato metanólico de Hs também apresentou efeito bacteriostático para *E.coli* e o de Hm para a cepa *S.cholerasuis* (ATCC®10708™). Já os extratos Hm de diclorometano demonstraram efeito bacteriostático para as cepas *P.aeruginosa* (ATCC® 9027™ e ATCC® 27853™).

Além da ação antimicrobiana, muitas pesquisas relatam a ação citoprotetora dos compostos fenólicos e sua eficácia na prevenção de patologias hepáticas relacionadas ao stress oxidativo. Na tentativa de averiguar essa afirmação, utilizou-se células da linhagem hepática humana HepG2 para avaliar a ação citoprotetora dos extratos metanólicos de *Hyptis* frente a danos induzidos por insultos oxidativos, bem como, sua ação na inibição de EROS intracelular. O efeito anti-inflamatório foi testado em células BV2 (capítulo 6). Os resultados garantiram efeitos antioxidantes significativos para extratos Hm, Hp e Hs ao proteger as células de danos ocasionadas por insultos em condições de co-tratamento e pré-tratamento. A citoproteção conferida aos extratos no regime de co-tratamento pode refletir ações diretas sobre os estressores associada a atividade sequestradora de radicais livres. Efeito esse que já havia sido apontado nos ensaios antioxidantes, com destaque para o ensaio superóxido. Já no regime de pré-tratamento, os extratos podem ter garantido a proteção pela promoção de um efeito antioxidante indireto influenciando as atividades das enzimas antioxidantes responsáveis pela modulação do equilíbrio redox das células (Kong *et al.*, 2016). Constatou-se que os três extratos à concentração de 100 µg/ml atuaram no controle da produção de EROs induzidos por t-BHP garantindo o efeito citoprotetor pela redução do estresse oxidativo. Os extratos de Hp e Hs promoveram a inibição da produção de NO sem prejuízo da viabilidade celular demonstrando uma possível ação anti-inflamatória.

Em conclusão, a Tese como um todo, contribuiu para a elucidação de atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, citoprotetora em ensaios *in vitro* das plantas medicinais Hm, Hp e Hs. Somado a isso, temos a possibilidade do uso de técnicas da cultura *in vitro* com vista à produção destas plantas medicinais e isolamento de seus metabólitos secundários com potencial bioativo. Por fim, mecanismos implícitos as potencialidades das plantas *Hyptis* para fins medicinais merecem serem investigados.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Os estudos incluídos nesta Tese foram realizados com o objetivo de fazer uma avaliação do potencial bioativo de três plantas medicinais encontradas no cerrado brasileiro. Hm, Hp e Hs são muito utilizadas na medicina tradicional no Brasil e várias outras partes do mundo, todavia, faltam estudos que comprovem cientificamente seus benefícios à saúde humana.

De posse dessa informação e do crescente interesse por novas fontes de medicamentos, buscou-se estudar o perfil fitoquímico, a toxicidade, potencial farmacológico e técnicas *in vitro* para produção de

metabólitos secundários. Os resultados confirmam a não toxicidade destas plantas em ensaios *in vitro*, bem como sua atividade antioxidante capaz de conferir proteção as células e, portanto, instigam mais trabalhos que possam vir a desenvolver aplicações de uso seguro e economicamente viáveis aproveitando todo o seu potencial.

Para os ensaios antioxidantes seria relevante padronizar protocolos e desenvolver testes com diferentes extratos de *Hyptis* e seus compostos isolados. Pode-se variar a parte da planta utilizada, a época e local de coleta, a forma de extração e o solvente utilizado. Estes ensaios subsidiariam novas avaliações para atividade citoprotetora que em virtude da sua importância para o descobrimento de potenciais drogas a serem utilizadas na prevenção de tratamento de doenças induzidas por stress oxidativo, como as neurodegenerativas, envelhecimento e do fígado, merecem ser investigadas. Sugere-se, como exemplo, que o potencial citoprotetor poderia ser avaliado em diferentes linhagens celulares correlacionando ensaios de pós, pré e co-tratamento com o estudo das atividades das enzimas antioxidantes e da eliminação de radicais livres. Se os resultados se confirmarem nestes ensaios *in vitro*, pode-se complementar os trabalhos com ensaios *in vivo* em animais para compreender o mecanismo molecular exato pelo qual o extrato exerce ação antioxidantes com efeitos protetores e para avaliar sua eficácia e segurança antes de seguir para os estudos em humanos.

Tendo-se em vista que a presença de compostos fenólicos pode ser um dos principais fatores que confere esta pronunciada ação antioxidante, torna-se relevante explorar as potencialidades da cultura *in vitro* de plantas *Hyptis* para produção de metabólitos e estudo das vias de biossíntese de metabólicos de interesse farmacológico. Isto implicaria em desenvolver novas estratégias, como melhoria das linhagens, otimização de meios e ambientes de cultura, a imobilização de células vegetais, a associação simbiótica entre plantas e microrganismos endofíticos, a permeabilização e a biotransformação. Já para a atividade antimicrobiana, há uma infinidade de metodologias e de microrganismos ainda não testados com extratos de *Hyptis* e que poderiam ser avaliados.

Por fim, enfatiza-se a necessidade de dar continuidade ao estudo dos extratos *Hyptis* a fim de averiguar suas possibilidades de aplicação farmacológicas.

Capítulo 8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPÍTULO 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abagli, A. Z., Alavo, T. B. C., Avlessi, F., e Moudachirou, M. (2012). Potential of the Bush Mint, *Hyptis suaveolens* Essential Oil for Personal Protection Against Mosquito Biting. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 28(1), 15–19. <https://doi.org/10.2987/11-6181.1>
- Abdel-Rahman, E. A., Mahmoud, A. M., Aaliya, A., Radwan, Y., Yasseen, B., Al-Okda, A., ... Ali, S. S. (2016). Resolving Contributions of Oxygen-Consuming and ROS-Generating Enzymes at the Synapse. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1089364>
- Abedini, A., Roumy, V., Mahieux, S., Biabiany, M., Standaert-Vitse, A., Rivière, C., Sahpaz, S., Bailleul, F., Neut, C., Hennebelle, T. (2013). Rosmarinic acid and its methyl ester as antimicrobial components of the hydromethanolic extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/604536>
- Abotaleb, M., Samuel, S. M., Varghese, E., Varghese, S., Kubatka, P., Liskova, A., e Büsselberg, D. (2019). Flavonoids in cancer and apoptosis. *Cancers*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/cancers11010028>
- Adda, C Atachi, P., Hell, K., e Tamò, M. (2011). Potential use of the bushmint, *Hyptis suaveolens*, for the control of infestation by the pink stalk borer, *Sesamia calamistis* on maize in southern Benin, West Africa. *Journal of Insect Science (Online)*, 11, 33. <https://doi.org/10.1673/031.011.0133>
- Adebisi, O. E., Olayemi, F. O., Ning-Hua, T., e Guang-Zhi, Z. (2017). In vitro antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of ethanol extract of stem and leaf of *Grewia carpinifolia*. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(1), 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2016.12.003>
- Aguiar, E. H. A., Zoghbi, M. D. G. B., Silva, M. H. L., Maia, J. G. S., Amasifén, J. M. R., e Rojas, U. M. (2003). Chemical variation in the essential oils of *hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. *Journal of Essential Oil Research*, 15(2), 130–132. <https://doi.org/10.1080/10412905.2003.9712089>
- Aguirre, C., Torres, I., Mendoza-Hernández, G., Garcia-Gasca, T., e Blanco-Labra, A. (2012). Analysis of protein fractions and some minerals present in chan (*Hyptis suaveolens* L.) seeds. *Journal of Food Science*, 77(1), 15–19. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02480.x>
- Aguirre, C., Valdés-Rodríguez, S., Mendoza-Hernández, G., Rojo-Domínguez, A., e Blanco-Labra, A. (2004). A novel 8.7 kDa protease inhibitor from chan seeds (*Hyptis suaveolens* L.) inhibits proteases from the larger grain borer *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 138(1), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.02.011>

- Aharoni, A., e Galili, G. (2011). Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 239–244. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.11.004>
- Aherne, S. A., Kerry, J. P., e O'Brien, N. M. (2007). Effects of plant extracts on antioxidant status and oxidant-induced stress in Caco-2 cells. *British Journal of Nutrition*, 97, 321–328. <https://doi.org/10.1017/S0007114507250469>
- Ahmed, M., Scora, R. W., e Ting, I. P. (1994). Composition of leaf oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. *Journal of Essential Oil Research*, 6(6), 571–575. <https://doi.org/10.1080/10412905.1994.9699348>
- Akanitapichat, P., Phraibung, K., Nuchklang, K., e Prompitakkul, S. (2010). Antioxidant and hepatoprotective activities of five eggplant varieties. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 3017–3021. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.07.045>
- Akar, Z., Küçük, M., e Doğan, H. (2017). A new colorimetric DPPH • scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 640–647. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1284068>
- Akobundo, I.O. e Agyakwa, C.W. (1998). 564 pp. A Handbook of West African Weeds. International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Oyo Road, PMB 5320, Ibadan, Nigeria.
- Albagli, S. (1998). Da biodiversidade à biotecnologia : a nova fronteira da informação. *Ci. Inf.*, 7–10. <https://doi.org/10.1590/S0100-19651998000100002>
- Albuquerque, U. P. (2010). Implications of Ethnobotanical Studies on Bioprospecting Strategies of New Drugs in Semi-Arid Regions. *The Open Complementary Medicine Journal*, 2, 21–23. <https://doi.org/10.2174/1876391X01002020021>
- Alves, T M.A.; Silva, A.F.; Brandão, M.; Grandi, T.S.M.; Smânia, E.F.A.; Smânia Jr., A.; Zani, C.L. (2000). Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95: 367-373.
- Alzahrani, H. A., Boukraa, L., Bellik, Y., Abdellah, F., Bakhotmah, B. A., Kolayli, S., e Sahin, H. (2012). Evaluation of the antioxidant activity of three varieties of honey from different botanical and geographical origins. *Global Journal of Health Science*, 4(6), 191–196. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v4n6p191>
- Amado, N. G., Cerqueira, D. M., Menezes, F. S., Mendes Da Silva, J. F., Neto, V. M., e Abreu, J. G. (2009). Isoquercitrin isolated from *Hyptis fasciculata* reduces glioblastoma cell proliferation and changes β -catenin cellular localization. *Anti-Cancer Drugs*, 20(7), 543–552. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e32832d1149>
- Amarante, C. B. do, Müller, A. H., Póvoa, M. M., e Dolabela, M. F. (2011). Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). *Acta Amazonica*, 41(3), 431–434. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672011000300015>

- Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, 1(DEC), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>
- Amusan, A. A. S., Idowu, A. B., e Arowolo, F. S. (2005). Comparative toxicity effect of bush tea leaves (*Hyptis suaveolens*) and orange peel (*Citrus sinensis*) oil extract on larvae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Tanzania Health Research Bulletin*, 7(September), 174–178. <https://doi.org/10.4314/thrb.v7i3.14256>
- Andrade, A. M., Oliveira, J. P. R., Santos, A. L. L. M., Franco, C. R. P., Antonioli, Â. R., Estevam, C. S., e Thomazzi, S. M. (2010). Preliminary study on the anti-inflammatory and antioxidant activities of the leave extract of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(6), 962–968. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000034>
- Andrade, E. L., Bento, A. F., Cavalli, J., Oliveira, S. K., Schwanke, R. C., Siqueira, J. M., ... Calixto, J. B. (2016). Non-clinical studies in the process of new drug development - Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 49(12), 1–19. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20165646>
- Andrade, H. B., Braga, A. F., Bertolucci, S. K. V., Hsie, B. S., Silva, S. T., e Pinto, J. E. B. P. (2017a). Effect of plant growth regulators, light intensity and LED on growth and volatile compound of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit in vitro plantlets. *Acta Horticulturae*, 1155, 277–284. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1155.40>
- Andrade, K. Q., Moura, F. A., dos Santos, J. M., de Araújo, O. R. P., Santos, J. C. de F., e Goulart, M. O. F. (2015). Oxidative stress and inflammation in hepatic diseases: Therapeutic possibilities of N-acetylcysteine. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 30269–30308. <https://doi.org/10.3390/ijms161226225>
- Andrade, T. A., Freitas, T. S., Araújo, F. O., Menezes, P. P., Dória, G. A. A., Rabelo, A. S., ... Coutinho, H. D. M. (2017b). Physico-chemical characterization and antibacterial activity of inclusion complexes of *Hyptis martiusii* Benth essential oil in β -cyclodextrin. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 89, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.158>
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 5–16. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf083>
- Annapandian, V. M., e Rajagopal, S. S. (2017). Phytochemical Evaluation and In vitro Antioxidant Activity of Various Solvent Extracts of *Leucas aspera* (Willd.) Link Leaves. *Free Radicals and Antioxidants*, 7(2), 166–171. <https://doi.org/10.5530/fra.2017.2.25>
- Araújo, E. C. C., Silveira, E. R., Lima, M. A. S., Neto, M. A., de Andrade, I. L., Lima, M. A. A., ... Mesquita, A. L. M. (2003). Insecticidal Activity and Chemical Composition of Volatile Oils from *Hyptis martiusii* Benth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(13), 3760–3762. <https://doi.org/10.1021/jf021074s>

- Arora, A., Nair, M. G., e Strasburg, G. M. (1998). Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(9), 1355–1363. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(97\)00458-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(97)00458-9)
- Arrigoni-Blank, M. F., Antonioli, A. R., Caetano, L. C., Campos, D. A., Blank, A. F., e Alves, P. B. (2008). Antinociceptive activity of the volatile oils of *Hyptis pectinata* L. Poit. (Lamiaceae) genotypes. *Phytomedicine*, 15(5), 334–339. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.09.009>
- Arrigoni-Blank, M. F., Silva-Mann, R., Campos, D. A., Silva, P. A., Antonioli, A. R., Caetano, L. C., Sant’Ana, A.E.G., Blank, A. F. (2005). Morphological, agronomical and pharmacological characterization of *Hyptis pectinata* (L.) Poit germplasm. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(4), 298–303. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000400007>
- Arul Ananth, D., Sivasudha, T., Rameshkumar, A., Jeyadevi, R., e Aseervatham, S. B. (2013). Chemical constituents, in vitro antioxidant and antimicrobial potential of *Caryota urens* L. *Free Radicals and Antioxidants*, 3(2), 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.fra.2013.05.008>
- Asekun, O. T. e Ekundayo, O. (2000). Essential Oil Constituents of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Bush Tea) Leaves from Nigeria, *Journal of Essential Oil Research*, 12:2, 227-230
- Asokkumar, K., Umamaheswari, M., Sivashanmugam, A. T., Subhadradevi, V., Subhashini, N., e Ravi, T. K. (2009). Free radical scavenging and antioxidant activities of *Glinus oppositifolius* (carpet weed) using different in vitro assay systems. *Pharmaceutical Biology*, 47(6), 474–482. <https://doi.org/10.1080/13880200902817901>
- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-wenzig, E., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., ... Stuppner, H. (2016). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products : A review. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1582–1614. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001>.
- Ávila-Reyes, J. A., Almaraz-Abarca, N., Chaidez-Ayala, A. I., Ramírez-Noya, D., Delgado-Alvarado, E. A., Torres-Ricario, R., ... Alanís-Bañuelos, R. E. (2018). Foliar phenolic compounds of ten wild species of Verbenacea as antioxidants and specific chemomarkers. *Brazilian Journal of Biology*, 78(1), 98–107. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.07516>
- Awah, F. M., e Verla, A. W. (2010). Antioxidant activity, nitric oxide scavenging activity and phenolic contents of *Ocimum gratissimum* leaf extract. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(24), 2479–2487. <https://doi.org/10.5897/jmpr10.262>
- Ayla, O. e Ogun, M. (2015). Biochemistry of reactive oxygen and nitrogen species, Basic principles and clinical significance of oxidative stress, Dr. Sivakumar Joghi Thatha Gowder (Ed.), *InTech*, <https://doi.org/10.5772/61193>
- Azcan, N., Ertan, A., e Demirci, B. (2004). *Salvia* Species growing in Turkey. *World*, 40(3), 186–188. <https://doi.org/10.1023/B:CONC.0000039127.56323.3e>
- Azevedo, N.R, Campos, I.F.P., Ferreira H.D., Portes, T.A., Seraphin, J.C., Paula, J. R., Santos, S.C., Ferri, P.H. (2002). Essential oil chemotypes in *Hyptis suaveolens* from Brazilian Cerrado. *Systematics and Ecology*, 30, 205–216.

- Babalola, O. O., Ojo, O. E., e Oloyede, F. A. (2011). Hepatoprotective activity of aqueous extract of the leaves of *Hyptis suaveolens* (L .) Poit on acetaminophen Induced hepatotoxicity in rabbits. *Research Journal of Chemical Sciences*, 1(7), 85–88.
- Bachheti, R. K., Rai, I., Joshi, A., e Satyan, R. S. (2015). Chemical composition and antimicrobial activity of *Hyptis suaveolens* Poit. seed oil from Uttarakhand State, India. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 15(2), 141–146. <https://doi.org/10.1007/s13596-015-0184-8>
- Bae, Y. S., Oh, H., Rhee, S. G., e Yoo, Y. Do. (2011). Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Molecules and Cells*, 32(6), 491–509. <https://doi.org/10.1007/s10059-011-0276-3>
- Bailac, P., Duschatzky, C., Ponzi, M., e Firpo, N. (1999). Essential oil of *hyptis mutabilis* (Rich.) briq. Grown in San Luis, Argentina. *Journal of Essential Oil Research*, 11(2), 217–219. <https://doi.org/10.1080/10412905.1999.9701115>
- Balasundram, N., Sundram, K., e Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Barbosa, A. G. R., Oliveira, C. D. M., Lacerda-Neto, L. J., Vidal, C. S., Saraiva, R. de A., da Costa, J. G. M., Coutinho, H.D.M., Galvão, H.B.F., Menezes, I. R. A. (2017). Evaluation of chemical composition and antiedematogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(2), 355–361. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.10.004>
- Barbosa, A., Martins, F. T., Teixeira, R. R., e Montanari, R. M. (2013). Chemical Variability and Biological Activities of Volatile Oils from *Hyptis suaveolens* (L .) Poit . *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 78(1), 1–10.
- Barbosa, C. V., Aquino, P. G. V, Ribeiro-Júnior, K. A. L., Moura, F. B. P., Alexandre-Moreira, M. S., Sant’Ana, A. E. G., ... Araújo-Júnior, J. X. (2012). Cytotoxic and antitumor activities of *Hyptis pectinata* (Sambacaitá) extract. *Pharmacologyonline*, 3(December), 70–74.
- Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. de C. G., De Paula, S. O., Minim, V. P. R., e Bressan, J. (2010). Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutricao*, 23(4), 629–643. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>
- Barbosa, L. F., De Medeiros, M. H. G., e Augusto, O. (2006). Danos oxidativos e neurodegeneração: O quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? *Quimica Nova*, 29(6), 1352–1360. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600034>
- Barbosa, P. P. P., e Ramos, C. P. (1992). Studies on the antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis mutabilis* Briq. in Rats. *Phytotherapy Research*, 6(2), 114–115. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650060214>

- Basilio, I.J.L.D., Agra, M. de F., Rocha, E.A., Leal, C.K.A. e Abrantes, H.F. (2006). Estudo Farmacobotânico Comparativo das Folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (*Lamiaceae*). *Acta Farm. Bonaerense* 25 (4): 518-25.
- Batista, F. L., De Paula, J. R., Silva, J. G., Santos, S. C., Ferri, P. H., e Ferreira, H. D. (2003). Essential oils of *hyptidendron canum* (Pohl ex Benth.) R. Harley and *hyptis velutina* pohl ex Benth. from Brazilian Cerrado. *Journal of Essential Oil Research*, 15(2), 88–89. <https://doi.org/10.1080/10412905.2003.9712075>
- Bauman, J. W., Madhu, C., McKim, J. M., Liu, Y., e Klaassen, C. D. (1992). Induction of hepatic metallothionein by paraquat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 117(2), 233–241. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(92\)90242-K](https://doi.org/10.1016/0041-008X(92)90242-K)
- Bayala, B., Bassole, I. H. N., Gnoula, C., Nebie, R., Yonli, A., Morel, L., ... Simpore, J. (2014). Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of essential oils of plants from Burkina Faso. *PLoS ONE*, 9(3), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092122>
- Begum, A. U., Venkatesh, S., Prakash, J., e Alvala, R. (2016a). Evaluation of glucose utilization capacity of bioactivity-guided fractions of *Barleria prionitis* Linn and *Hyptis suaveolens* (L.) Poit in isolated rat hemidiaphragm. *AYU*, 37(2), 145–150. <https://doi.org/10.4103/ayu.AYU>
- Begum, A., Sama, V., e Dodle, J. P. (2016b). Study of antinociceptive effects on acute pain treated by bioactive fractions of *Hyptis suaveolens*. *Journal of Acute Disease*, 5(5), 397–401. <https://doi.org/10.1016/j.joad.2016.08.006>
- Benabdallah, A., Rahmoune, C., Boumendjel, M., Aissi, O., e Messaoud, C. (2016). Total phenolic content and antioxidant activity of six wild *Mentha* species (*Lamiaceae*) from northeast of Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(9), 760–766. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.06.016>
- Benelli, G., Flamini, G., Canale, A., Cioni, P., e Conti, B. (2012). Toxicity of some essential oil formulations against the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera Tephritidae). *Crop Prot*, 42(42), 223–229.
- Bertucci, A., Olivaro, C., Da Silva, P. A., Ramos, D., Cerdeiras, M. P., e Vázquez, A. (2009). Initial antimicrobial activity studies of plants of the riverside forests of the southern Uruguay River. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19(1 A), 20–25. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000100005>
- Bezerra, J. W. A., Costa, A. R., da Silva, M. A. P., Rocha, M. I., Boligon, A. A., da Rocha, J. B. T., ... Kamdem, J. P. (2017). Chemical composition and toxicological evaluation of *Hyptis suaveolens* (L.) Poiteau (LAMIACEAE) in *Drosophila melanogaster* and *Artemia salina*. *South African Journal of Botany*, 113, 437–442. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.10.003>
- Bhatt, R., Mishra, N., e Bansal, P. K. (2013). Phytochemical, Pharmacological and Pharmacokinetics Effects of Rosmarinic Acid. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, 2(2), 28–34. <https://doi.org/10.7897/2277-4572.02215>
- Bhojwani, S., e Razdan, M. K. (1996). Production of secondary metabolites. In *Plant tissue culture: theory and practice, a revised edition*. ISBN: 0-444-81623-2

- Bhuiyan, N. I., Begum, J., e Nandi, N. C. (2010). Chemical component studies on the leaf and inflorescence essential oil of *Hyptis brevipes* (Poit .), *4*(20), 2128–2131.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., e Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, *5*(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Bispo, M. D., Mourão, R. H. V., Franzotti, E. M., Bomfim, K. B. R., de Arrigoni-Blank, M. F., Moreno, M. P. N., ... Antonioli, A. R. (2001). Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, *76*(1), 81–86. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00172-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00172-6)
- Boalino, D. M., Connolly, J. D., McLean, S., Reynolds, W. F., e Tinto, W. F. (2003). α -Pyrone and a 2(5H)-furanone from *Hyptis pectinata*. *Phytochemistry*, *64*(7), 1303–1307. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.08.017>
- Bojórquez-Velázquez, E., Lino-López, G. J., Huerta-Ocampo, J. A., Barrera-Pacheco, A., Barba De La Rosa, A. P., Moreno, A., ... Osuna-Castro, J. A. (2016). Purification and biochemical characterization of 11S globulin from chan (*Hyptis suaveolens* L. Poit) seeds. *Food Chemistry*, *192*, 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.099>
- Boligon, A. A., Athayde, M. L. M. M. M. and M. L., Machado, M. M., e Athayde, M. L. M. M. M. and M. L. (2014). Medicinal chemistry technical evaluation of antioxidant activity. *Medicinal Chemistry*, *4*(7), 517–522. <https://doi.org/10.4172/2161-et>
- Bononi, V. L. R. (2010). *Biodiversidade*. (S. do M. Ambiente, Ed.). São Paulo.
- Botrel, P. P., Pinto, J. E. B. P., De Araújo, A. C. C., Bertolucci, S. K. V., Figueiredo, F. C., Ferri, P. H., e Da Costa, D. P. (2010b). Variações no teor e na composição volátil de *Hyptis marrubioides* EPL. Cultivada no campo e em casa de vegetação. *Química Nova*, *33*(1), 33–37. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000100007>
- Botrel, P. P., Pinto, J. E. B. P., Ferraz, V., Bertolucci, S. K. V., e Figueiredo, F. C. (2010a). Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. *Acta Scientiarum - Agronomy*, *32*(3), 533–538. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v32i3.3415>
- Botrel, P. P., Pinto, J. E. B. P., Ferri, P. H., Bertolucci, S. K. V., e Figueiredo, F. C. (2009). Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* Epling (Lamiaceae) em diferentes genótipos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, *11* (2), 164–169. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v32i3.3415>
- Brader, G., Tas, É., e Palva, E. T. (2001). Jasmonate-Dependent Induction of Indole Glucosinolates in *Arabidopsis* by Culture Filtrates of the Nonspecific Pathogen *Erwinia carotovora*. *Plant Physiology*, *126*, 849–860.

- Brahmi, F., Khodir, M., Mohamed, C., e Pierre, D. (2017). Chemical composition and biological activities of *Mentha* species. In *Aromatic and Medicinal Plants - Black to Nature* (Vol. 2, p. 64). <https://doi.org/10.5772/67291>
- Brandão, M. G. L., Pignal, M., Romaniuc, S., Graef, C. F. F., e Fagg, C. W. (2012). Useful Brazilian plants listed in the field books of the French naturalist Auguste de Saint-Hilaire (1779-1853). *Journal of Ethnopharmacology*, *143*(2), 488–500. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.06.052>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., e Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, *28*(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brazil. (2003). Ministry of the Environment. Secretariat for Biodiversity and Forests. Directorate for Biodiversity Conservation. National Biological Diversity Strategy Project. Evaluation of the state of knowledge on biological diversity in Brazil: executive summary / National Biological Diversity Strategy Project. Brasília: MMA. Disponível em https://www.researchgate.net/profile/Paulo_Prado5/publication/271644750_Biodiversity_of_Brazil_a_synthesis_of_the_current_state_of_knowledge/links/551dcf360cf29dcabb033bc9/Biodiversity-of-Brazil-a-synthesis-of-the-current-state-of-knowledge.pdf. Acesso em 20/10/2018
- Briskin, D. P. (2007). Biotechnological Methods for Selection of High-Yielding Cell Lines and Production of Secondary Metabolites in Medicinal Plants. In O. Kayser e W. J. Quax (Eds.), *Medicinal Plant Biotechnology From Basic Research to Industrial Applications* (p. 604).
- Broeckling, C. D., Huhman, D. V., Farag, M. A., Smith, J. T., May, G. D., Mendes, P., ... Sumner, L. W. (2005). Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. *Journal of Experimental Botany*, *56*(410), 323–336. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri058>
- Bueno, A. X., Moreira, A. T. S., Silva, F. T., e Estevam, C. S. (2006). Effects of the aqueous extract from *Hyptis pectinata* leaves on rodent central nervous system. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, *16*(3), 317–323. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000300007>
- Byun, S. Y., e Pedersen, H. (1994). Two-Phase Airlift Fermentor Operation with Elicitation for the Enhanced Production of Benzophenanthridine Alkaloids in Cell Suspensions of *Escherichia californica*. *Biotechnology Advances*, *44*, 14–20.
- Caldas, G. F. R., Da Silva Oliveira, A. R., Araújo, A. V., Quixabeira, D. C. A., Da Costa Silva-Neto, J., Costa-Silva, J. H., ... Wanderley, A. G. (2014). Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae). *PLoS ONE*, *9*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084400>
- Caldas, G. F. R., Do Amaral Costa, I. M. Ê., Da Silva, J. B. R., Da Nóbrega, R. F., Rodrigues, F. F. G., Da Costa, J. G. M., e Wanderley, A. G. (2011). Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, *137*(1), 886–892. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.07.005>
- Camacho-Corona, M. D. R., García, A., Mata-Cárdenas, B. D., Garza-González, E., Ibarra-Alvarado, C., Rojas-Molina, A., ... Gutiérrez, S. P. (2015). Screening for antibacterial and antiprotozoal activities of

- crude extracts derived from mexican medicinal plants. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 12(3), 104–112. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v12i3.13>
- Campos, D. V. B. da. (2018). Avaliação de efeitos neuroprotetores de extratos de plantas medicinais. *Dissertação de mestrado*, Universidade do Minho, Braga, Portugal.
- Campos, I. F. P., Ferreira, H. D., Portes, T. A., Seraphin, J. C., Paula, J. R., Silva, J. G., ... Ferri, P. H. (2002). Volatile constituents of *hyptis suaveolens* (L.) Poit. from Brazilian cerrado. *Acta Horticulturae*, 569, 195–201. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.569.31>
- Carlet, J., Jarlier, V., Harbarth, S., Voss, A., Goossens, H., e Pittet, D. (2012). Ready for a world without antibiotics? The Pensières Antibiotic Resistance Call to Action. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 1, 1–13. <https://doi.org/10.1186/2047-2994-1-11>
- Casas-Grajales, S., e Muriel, P. (2015). Antioxidants in liver health. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 6(3), 59–72. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v6.i3.59>
- Castaneda-Arriaga, R., Pérez-González, A., Reina, M., Alvarez-Idaboy, J. R., e Galano, A. (2018). Comprehensive Investigation of the Antioxidant and Pro-oxidant Effects of Phenolic Compounds: A Double-Edged Sword in the Context of Oxidative Stress? *Journal of Physical Chemistry B*, 122(23), 6198–6214. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b03500>
- Cavalcanti, B. C., Moura, D. J., Rosa, R. M., Moraes, M. O., Araujo, E. C. C., Lima, M. A. S., ... Costa-Lotufo, L. V. (2008). Genotoxic effects of tanshinones from *Hyptis martiusii* in V79 cell line. *Food and Chemical Toxicology*, 46(1), 388–392. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.08.009>
- Celedón, P. A. F., Kobayashi, A. K., e Vieira, L. G. E. (2000). Utilização de nutrientes por células de algodoeiro cultivadas em suspensão. *Scientia Agricola*, 431–437.
- Cezarotto, V. S., Giacomelli, S. R., Vendruscolo, M. H., Vestena, A. S., Cezarotto, C. S., Da Cruz, R. C., ... Cruz, L. (2017). Influence of harvest season and cultivar on the variation of phenolic compounds composition and antioxidant properties in *vaccinium ashei* leaves. *Molecules*, 22(10), 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules22101603>
- Chan, S., Li, S., Kwok, C., Benzie, I., Szeto, Y., Guo, D. J., He, X.P. e Yu, P.H.F (2008). Antioxidant activity of chinese medicinal herbs. *Pharmaceutical Biology*, 46(9), 587–595. <https://doi.org/10.1080/13880200802179667>
- Chansiw, N., Chotinantakul, K., e Srichairatanakool, S. (2018). Anti-inflammatory and Antioxidant Activities of the Extracts from Leaves and Stems of *Polygonum odoratum* Lour. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 18(1), 45–54. <https://doi.org/10.2174/1871523017666181109144548>
- Chatri, M., Baktiar, A., Mansyurdin, M., e Periadnadi, P. (2018). Leaf Trichomes Morphology of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (LAMIACEAE). *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 335, 12020. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/335/1/012020>

- Chattopadhyay, R. R., Bhattacharyya, S. K., Medda, C., Chanda, S., e Bag, A. (2009). A comparative evaluation of antibacterial potential of some plants used in Indian traditional medicine for the treatment of microbial infections. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(5), 1123–1128. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000500009>
- Chen, C.-C., Bates, R., e Carlson, J. (2014). Effect of environmental and cultural conditions in medium pH and plant growth performance of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) shoot culture. *F1000Research*, (0), 1–16. <https://doi.org/10.12688/f1000research.5919.1>
- Chen, Z., Bertin, R., e Froidi, G. (2013). EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chemistry*, 138(1), 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.001>
- Chikezie, P. C., Ibegbulem, C. O., e Mbagwu, F. N. (2015). Bioactive Principles from Medicinal Plants. *Research Journal of Phytochemistry*, 9(3), 88–115. <https://doi.org/10.3923/rjphyto.2015.88.115>
- Cho, N., Moon, E. H., Kim, H. W., Hong, J., Beutler, J. A., e Sung, S. H. (2016). Inhibition of Nitric Oxide Production in BV2 Microglial Cells by Triterpenes from *Tetrapanax papyriferus*. *Molecules*, 21(459), 1–9. <https://doi.org/10.3390/molecules21040459>
- Chopra, I., Hesse, L., e O'Neill, A. (2002). Discovery and Development of New Anti-Bacterial Drugs. *Elsevier Science*, 213–225. [https://doi.org/10.1016/S0165-7208\(02\)80022-8](https://doi.org/10.1016/S0165-7208(02)80022-8)
- Chu, C.-C., Wu, W.-S., Shieh, J.-P., Chu, H.-L., Lee, C.-P., e Duh, P.-D. (2017). The Anti-Inflammatory and Vasodilating Effects of Three Selected Dietary Organic Sulfur Compounds from *Allium* Species. *Journal of Functional Biomaterials*, 8(1), 5. <https://doi.org/10.3390/jfb8010005>
- Chukwujekwu, J. C., Smith, P., Coombes, P. H., Mulholland, D. A., e Van Staden, J. (2005). Antiplasmodial diterpenoid from the leaves of *Hyptis suaveolens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(2), 295–297. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.018>
- Chung, L.-M., Thiruvengadam, M., Rekha, K., e Rajakumar, G. (2016). Elicitation Enhanced the Production of Phenolic Compounds and Biological Activities in Hairy Root Cultures of Bitter melon (*Momordica charantia* L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59(December), 1–10.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-Ninth Edition. *CLSI document M07-A9*.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2014). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. *CLSI document M100-S24*.
- Collin, H. A. (2001). Secondary product formation in plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, 34, 119–134. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1987.tb03616.x>
- Conceição, L. F. R., Ferreres, F., Tavares, R. M., e Dias, A. C. P. (2006). Induction of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. cells by *Colletotrichum gloeosporioides* elicitation. *Phytochemistry*, 67, 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.10.017>

- Conti, B., Benelli, G., Flamini, G., Cioni, P. L., Profeti, R., Ceccarini, L., Macchic, M e Canale, A. (2012). Larvicidal and repellent activity of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) essential oil against the mosquito *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 110(5), 2013–2021. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2730-8>
- Conti, B., Canale, A., Cioni, P. L., Flamini, G., e Rifici, A. (2011). *Hyptis suaveolens* and *Hyptis spicigera* (Lamiaceae) essential oils: Qualitative analysis, contact toxicity and repellent activity against *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Dryophthoridae). *Journal of Pest Science*, 84(2), 219–228. <https://doi.org/10.1007/s10340-010-0343-0>
- Correa, M.P. (1931). Dicionario das plantas Úteis e das Exóticas Cultivadas. *Imprensa Nacional*. Rio de Janeiro, p. 363.
- Costa, J. G. M., Rodrigues, F. F. G., Angélico, E. C., Silva, M. R., Mota, M. L., Santos, N. K. a., ... Lemos, T. L. G. (2005). Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(4), 304–309. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000400008>
- Costa, M. T., Rita, C. F., Aptekmann, K. P., e Machado, R. R. (2003). Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. *Ciência Rural*, 33(5), 967–974. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782003000500027>
- Costa, V. C. D. O., Tavares, J. F., Silva, A. B., Duarte, M. C., Agra, M. D. F., Barbosa-Filho, J. M., ... Silva, M. S. (2014). Hyptenolide, a new α -pyrone with spasmolytic activity from *Hyptis macrostachys*. *Phytochemistry Letters*, 8(1), 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.01.009>
- Coutinho, H. D. M., Costa, J. G. M., Falcão-Silva, V. S., Siqueira-Júnior, J. P., e Lima, E. O. (2010). *In vitro* additive effect of *Hyptis martiusii* in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharmaceutical Biology*, 48(9), 1002–1006. <https://doi.org/10.3109/13880200903382686>
- Coutinho, H. D. M., Costa, J. G. M., Lima, E. O., Falcão-silva, V. S., e Siqueira-Júnior, J. P. (2009). In vitro interference of *Hyptis martiusii* Benth. and chlorpromazine against an aminoglycoside - resistant *Escherichia coli*. *Indian Journal Of Medical Research*, 129, 566–568.
- Coutinho, H. D. M., Costa, J. G. M., Siqueira-Júnior, J. P., e Lima, E. O. (2008). *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18(SUPPL.), 670–675. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000500005>
- Crozier, A., Jaganath, I. B., e Clifford, M. N. (2006). Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, (November), 1–24. <https://doi.org/10.1002/9780470988558.ch1>
- Cruz Araújo, E. C., Lima, M. A. S., Montenegro, R. C., Nogueira, M., Costa-Lotufo, L. V., Pessoa, C., ... Silveira, E. R. (2006). Cytotoxic abietane diterpenes from *Hyptis martiusii* Benth. *Zeitschrift Fur*

Naturforschung - Section C Journal of Biosciences, 61(3–4), 177–183. <https://doi.org/10.1515/znc-2006-3-404>

Cunha, J. A., Sutili, F. J., Oliveira, A. M., Gressler, L. T., Scheeren, C. de A., Silva, L. de L., ... Heinzmann, B. M. (2017). The Essential Oil of *Hyptis mutabilis* in *Ichthyophthirius multifiliis* Infection and its Effect on Hematological, Biochemical, and Immunological Parameters in Silver Catfish, *Rhamdia quelen*. *Journal of Parasitology*, 103(6), 778–785. <https://doi.org/10.1645/16-174>

Dai, J., e Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>

Danciu, C., Antal, D. S., Ardelean, F., Chis, A. R., Soica, C., Andrica, F., e Dehelean, C. (2017). New insights regarding the potential health benefits of isoflavones. In J. Justino (Ed.), *Flavonoids - From biosynthesis to human health*. <https://doi.org/10.5772/32009>

Dar, R. A., Shahnawaz, M., Qazi, P. H., e Qazi, H. (2017). General overview of medicinal plants: A review. *The Journal of Phytopharmacology*, 6(6), 349–351. Retrieved from www.phytopharmajournal.com

Darias, V., Bravo, L., Rabanal, R., Sanchez-Mateo, C. C., e Martin-Herrera, D. A. (1990). Cytostatic and antibacterial activity of some compounds isolated from several lamiaceae species from the canary islands. *Planta Medica*, 56(1), 70–72. <https://doi.org/10.1055/s-2006-960887>

Das, J., Ghosh, J., Roy, A., e Sil, P. C. (2012). Mangiferin exerts hepatoprotective activity against D-galactosamine induced acute toxicity and oxidative/nitrosative stress via Nrf2-NFκB pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 260(1), 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.01.015>

De Figueirêdo, F.R.S.D.N., Primo, A.J.B., Monteiro, Á.B., Tintino, S.R., Delmondes, G.A., Sales, V. S., Rodrigues, C.K.S, Rodrigues, C.K. S, Felipe, C.F.B, Coutinho, H.D.M., Kerntoph, M. R. (2018). Avaliação da atividade moduladora e citotóxica do óleo essencial das folhas de *Hyptis martiusii* Benth. *Rev Cienc Salud*. 16(1):49-58. Doi: <http://dx.doi.org/10.12804/revistas.urosario.edu.co/revsalud/a.6489>

De Queiroz, A. C., Dias, T. de L. M. F., Da Matta, C. B. B., Cavalcante Silva, L. H. A., de Araújo-Júnior, J. X., de Araújo, G. B., ... Alexandre-Moreira, M. S. (2014). Antileishmanial activity of medicinal plants used in endemic areas in northeastern Brazil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 2014(i), 478290. <https://doi.org/10.1155/2014/478290>

Deepa, A. G., Nair, B.J., Sivakumar T. T., Joseph A.P. (2014). Uncommon opportunistic fungal infections of oral cavity: A review. *Journal Oral Maxillofac Pathol* 18:235-43.

Deepika Priyadarshini, S., e Sujatha, V. (2013). Antioxidant and cytotoxic studies on two known compounds isolated from *Hyptis suaveolens* leaves. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(4), 283–290.

Degáspari, C. H., e Waszczyński, N. (2004). Propriedades Antioxidantes De Compostos Fenólicos. *Visão Acadêmica*, 5(1), 33–40. <https://doi.org/10.5380/acd.v5i1.540>

- Del Ré, P. V., e Jorge, N. (2012). Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 389–399. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000200021>
- Delbin, M. A., Antunes, E., e Zanesco, A. (2009). Role of exercise training on pulmonary ischemia/reperfusion and inflammatory response. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, 24(4), 552–561. <https://doi.org/10.1590/S0102-76382009000500017>
- Dellacassa, E., Lofenzo, D., Mondello, L., e D'alcontres, I. S. (1997). Uruguayan essential oils. Part viii. Composition of leaf oil of hyptis floribunda briq. Ex micheli (Labiatae). *Journal of Essential Oil Research*, 9(5), 523–525. <https://doi.org/10.1080/10412905.1997.9700769>
- Deng, J., Cheng, W., e Yang, G. (2011). A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*, 125(4), 1430–1435. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.031>
- Dharini, M., Salma, P., e Kothari, V. (2010). Antioxidant Therapy : Potential and Limitations Antioxidant Therapy : Potential and Limitations, (June 2017).
- Dhawan, V. (2014). Reactive oxygen and nitrogen species: general considerations. In N. Ganguly, S. Jindal, S. Biswal, P. Barnes, e R. Pawankar (Eds.), *Studies on Respiratory disorders. Oxidative stress in applied basic research and clinical practice*. (1st ed., p. 27 a 47). New York: Humana press. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0497-6>
- Diesen, D. L., e Kuo, P. C. (2011). Nitric Oxide and Redox Regulation in the Liver: Part I General Considerations and Redox biology in Hepatitis. *Journal of Surgery Research*, 162(1), 95–109. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2009.09.019>
- Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C., e Almeida, L. M. (1994). Action of phenolic derivates (acetaminophen salicylate and 5- aminosaliclylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315(1), 161–169.
- Diniz, L. R. L., Vieira, C. F. X., Santos, E. C. Dos, Lima, G. C., Aragão, K. K. V., Vasconcelos, R. P., ... Coelho-De-Souza, A. N. (2013). Gastroprotective effects of the essential oil of Hyptis crenata Pohl ex Benth. on gastric ulcer models. *Journal of Ethnopharmacology*, 149(3), 694–700. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.07.026>
- Dos Anjos, K.S, Araújo-Filho, H. G., Duarte, M.C., Costa, V.C.O., Tavares, J.F., Silva, M.S., Almeida, J.R.G.S, Souza, N.A.C., Rolim, L. A, Menezes, I.R.A, Coutinho, H.D.M., Quintans, J.S.S, Quintans-Júnior, L.J.(2017).HPLC-DAD analysis, antinociceptive and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract of *Hyptis umbrosa* in mice. *EXCLI Journal 2017*, ISSN 1611-2156.
- Dowom, S. A., Abrishamchi, P., Radjabian, T., e Salami, S. A. (2017). Enhanced phenolic acids production in regenerated shoot cultures of *Salvia virgata* Jacq. after elicitation with Ag⁺ ions, methyl jasmonate and yeast extract. *Industrial Crops and Products*, 103, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.043>

- Duarte-Almeida J.M.; Santos R. J.; Genovese M. I.; Lajolo F.M. (2006). Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais Dpph. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 26(2), 446–452. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000200031>
- Dubin, A. E., e Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: The sensors of the pain pathway. *Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3760–3772. <https://doi.org/10.1172/JCI42843>
- Dutra, R. C., Campos, M. M., Santos, A. R. S., e Calixto, J. B. (2016). Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*, 112, 4–29. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.021>
- Elumalai, D., Hemavathi, M., Deepaa, C. V., e Kaleena, P. K. (2017). Evaluation of phytosynthesised silver nanoparticles from leaf extracts of *Leucas aspera* and *Hyptis suaveolens* and their larvicidal activity against malaria, dengue and filariasis vectors. *Parasite Epidemiology and Control*, 2(4), 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2017.09.001>
- Emami, S. A., Asili, J., Mohagheghi, Z., e Hassanzadeh, M. K. (2007). Antioxidant activity of leaves and fruits of Iranian conifers. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 4(3), 313–319. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem011>
- Eshilokun, A. O., Kasali, A. A., e Giwa-Ajeniya, A. O. (2005). Chemical composition of essential oils of two *Hyptis suaveolens* (L.) Poit leaves from Nigeria. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(5), 528–530. <https://doi.org/10.1002/ffj.1452>
- Espin, J. C., Soler-Rivas, C., Wichers, H. J., e García-Viguera, C. (2000). Anthocyanin-based natural colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1588–1592. <https://doi.org/10.1021/jf9911390>
- Ewing, J. F., e Janero, D. R. (1995). Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Analytical Biochemistry*, 232(2), 243–248. <https://doi.org/10.1006/abio.1995.0014>
- Fabry, W., Okemo, P. O., e Ansorg, R. (1998). Antibacterial activity of East African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 60(1), 79–84. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(97\)00128-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00128-1)
- Facey, P. C., Porter, R. B., Reese, P. B., e Williams, L. A. (2005). Biological activity and chemical composition of the essential oil from Jamaican *Hyptis verticillata* Jacq. *J Agric Food Chem*, 53(12), 4774–4777. <https://doi.org/10.1021/jf050008y>
- Falcão, D. Q. (2003). *Estudo Químico e Farmacológico de Quatro Espécies de Hyptis do Estado do Rio Grande do Sul*. Universidade Federal do Rio de Janeiro (Dissertação de Mestrado).
- Falcão, D. Q. e Menezes, F. S. (2003). The *Hyptis* genus: an ethnopharmacological and chemical review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 8(3), 69–74.
- Falcão, D. Q., Fernandes, S. B. O., e Menezes, F. S. (2003). Triterpenos de *Hyptis fasciculata* Benth. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13, 81–83. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2003000300030>

- Falcao, R. A., Do Nascimento, P. L. A., De Souza, S. A., Da Silva, T. M. G., De Queiroz, A. C., Da Matta, C. B. B., ... Silva, T. M. S. (2013). Antileishmanial phenylpropanoids from the leaves of *Hyptis pectinata* (L.) poit. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/460613>
- Falcão, R. E. A., de Souza, S. A., Camara, C. A., Quintans, J. S. S., Santos, P. L., Correia, M. T. S., ... Guimarães, A. G. (2016). Evaluation of the orofacial antinociceptive profile of the ethyl acetate fraction and its major constituent, rosmarinic acid, from the leaves of *Hyptis pectinata* on rodents. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 26(2), 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.029>
- Farjaminezhad, R., Zare, N., Asghari-Zakaria, R., e Farjaminezhad, M. (2013). Establishment and optimization of cell growth in suspension culture of *Papaver bracteatum*: A biotechnology approach for thebaine production. *Turkish Journal of Biology*, 37(6), 689–697. <https://doi.org/10.3906/biy-1304-54>
- Farley, J. (2012). Ecosystem services: The economics debate. *Ecosystem Services*, 1(1), 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.ecoser.2012.07.002>
- Farzaei, M. H., Zobeiri, M., Parvizi, F., El-Senduny, F. F., Marmouzi, I., Coy-Barrera, E., ... Abdollahi, M. (2018). Curcumin in liver diseases: A systematic review of the cellular mechanisms of oxidative stress and clinical perspective. *Nutrients*, 10(7), 1–28. <https://doi.org/10.3390/nu10070855>
- Feitosa-Alcantara, R. B., Bacci, L., Blank, A. F., Alves, P. B., Silva, I. M. D. A., Soares, C. A., ... Arrigoni-Blank, M. D. F. (2017). Essential oils of *Hyptis pectinata* chemotypes: Isolation, binary mixtures and acute toxicity on leaf-cutting ants. *Molecules*, 22(4). <https://doi.org/10.3390/molecules22040621>
- Ferreira, E. C., Faria, L. C., Santos, S. C., Ferri, P. H., Silva, J. G., Paula, J. R., e Ferreira, H. D. (2005). Essential oils of *hyptis conferta* pohl ex benth. var. *conferta* and *hyptis conferta* pohl ex benth. var. *angustata* (Briq.) Pohl ex Harley from Brazilian Cerrado. *Journal of Essential Oil Research*, 17(2), 145–146. <https://doi.org/10.1080/10412905.2005.9698859>
- Ferreira, I. C. F. R., e Abreu, R. M. V. (2007). Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise*, Ano 11(2), 32–39. Retirado de [https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/2711/1/Publicação_Nacional_Sress oxidativo.pdf](https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/2711/1/Publicação_Nacional_Sress%20oxidativo.pdf)
- Ferreira, S. N., e Sampaio, M. J. A. (2013). *Biodiversidade e conhecimentos tradicionais associados: implementação da legislação de acesso e repartição de benefícios no Brasil*. (SBPC, Ed.), *Animal Genetics*. Brasília.
- Firuzi, O., Javidnia, K., Gholami, M., Soltani, M., e Miri, R. (2010). Antioxidant activity and total phenolic content of 24 lamiaceae species growing in Iran. *Natural Product Communications*, 5(2), 261–264. <https://doi.org/10.1177/1934578x1000500219>
- Fisher-Wellman, K., Bell, H. K., e Bloomer, R. J. (2009). Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms linked to exercise during cardiopulmonary and metabolic disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(1), 43–51. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.1.7732>

- Flora Filho, R., e Zilberstein, B. (2000). Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 46(3), 265–271. <https://doi.org/10.1590/S0104-4230200000300012>
- Flores, M., Rojas, L., Aparicio, R., Lucena, M. E., e Usubillaga, A. (2014). Essential oil composition and antibacterial activity of *Hyptis colombiana* (Epling) from the Venezuelan Andes. *Natural Product Communications*, 9, N. 0(2014), 1–2. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1937-6>. Raio
- Foglio, M. A., Queiroga, C. L., Sousa, M. I. de O., e Rodrigues, R. A. F. (2006). Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos : Um Modelo Multidisciplinar. *MultiCiências*.
- Franco, C. R. P., Alves, P. B., Andrade, D. M., de Jesus, H. C. R., Silva, E. J. S., Santos, E. A. B., ... Quintans-Júnior, L. J. (2011a). Essential oil composition and variability in *Hyptis fruticosa*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 21(1), 24–32. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000034>
- Franco, C. R. P., Antonioli, Â. R., Guimarães, A. G., Andrade, D. M., de Jesus, H. C. R., Alves, P. B., ... Botelho, M. A. (2011b). Bioassay-guided Evaluation of Antinociceptive Properties and Chemical Variability of the Essential Oil of *Hyptis fruticosa*. *Phytotherapy Research*, 25(11), 1693–1699. <https://doi.org/10.1002/ptr.3455>
- Franco, J. M., Pugine, S. M. P., Scatoline, A. M., e De Melo, M. P. (2018). Antioxidant capacity of *Melissa officinalis* L. On biological systems. *Eclética Química Journal*, 43(3), 19–29. <https://doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v43.3.p19-29>
- Frieri, M., Kumar, K., e Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, 10(4), 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>
- Gadzovska, S., Maury, S., Delaunay, A., Spasenoski, M., Joseph, C., e Hagège, D. (2007). Jasmonic acid elicitation of *Hypericum perforatum* L. cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphthodianthrones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 89(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9203-x>
- Gaire, B. P., Jamarkattel-Pandit, N., Lee, D., Song, J., Kim, J. Y., Park, J., ... Kim, H. (2013). Terminalia chebula extract protects OGD-R induced PC12 cell death and inhibits LPS induced microglia activation. *Molecules*, 18(3), 3529–3542. <https://doi.org/10.3390/molecules18033529>
- Garcia, E. J., Oldoni, T. L. C., Alencar, S. M. de, Reis, A., D. Loguercio, A., e Grande, R. H. M. (2012). Antioxidant Activity by DPPH Assay of Podential Solutions to be Applied on Bleached Teeth. *Brazilian Dental Journal*, 23(1), 22–27. <https://doi.org/10.1056/NEJM197611182952105>
- Garland, E. (2012). Pain Processing the Human Nervous System: A Selective Review of Nociceptive and Biobehavioral Pathway. *Primary Care - Clinics in Office Practice*, 39(3), 561–571. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2012.06.013>. Pain
- Gavani, U., e Paarakh, P. M. (2008). Antioxidant activity of *Hyptis suaveolens* Poit. *International Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.3923/ijp.2008.227.229>

- Ghaffari, H., Ghassam, B. J., Chandra Nayaka, S., Ramachandra Kini, K., e Prakash, H. S. (2014). Antioxidant and neuroprotective activities of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. against oxidative stress-induced neurotoxicity. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *34*(3), 323–331. <https://doi.org/10.1007/s10571-013-0016-7>
- Ghaffari, H., Ghassam, B. J., e Prakash, H. S. (2012). Hepatoprotective and cytoprotective properties of *Hyptis suaveolens* against oxidative stress-induced damage by CCl₄ and H₂O₂. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *5*(11), 868–874. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60162-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60162-X)
- Gillij, Y. G., Gleiser, R. M., e Zygadlo, J. A. (2008). Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresource Technology*, *99*(7), 2507–2515. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.066>
- Goleniowski, M., Bonfill, M., Cusido, R., e Palazón, J. (2013). Phenolic Acids. In k. G. Ramawat e J. M. Mérillon (Eds.), *Natural Products*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6>
- Goly, K. R. C., Soro, Y., Dadie, A., Kassi, A. B. B., e Dje, M. (2015). Antibacterial activity of essential oils and extracts from the leaves of *Hyptis suaveolens* and *Lippia multiflora* on multi-resistant bacteria. *Rasayan Journal of Chemistry*, *8*(4), 396–403.
- Gordaliza, M. (2009). Terpenyl-purines from the sea. *Marine Drugs*, *7*(4), 833–849. <https://doi.org/10.3390/md7040833>
- Gowda, D. C. (1984). Polysaccharide components of the seed-coat mucilage from *Hyptis suaveolens*. *Phytochemistry*, *23*(2), 337–338. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)80329-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80329-5)
- Grassi, P., Nuñez, M. J., Varmuza, K., e Franz, C. (2005). Chemical polymorphism of essential oils of *Hyptis suaveolens* from El Salvador. *Flavour and Fragrance Journal*, *20*(2), 131–135. <https://doi.org/10.1002/ffj.1393>
- Grassi, P., Urias Reyes, T. S., Sosa, S., Tubaro, A., Hofer, O., e Zitterl-Eglseer, K. (2006). Anti-inflammatory activity of two diterpenes of *Hyptis suaveolens* from El Salvador. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, *61*(3–4), 165–170.
- Gravena, R., Júnior, P., e Júnior, B. (2002). DO Growth Analysis of *Hyptis suaveolens*, 189–196. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582002000200004>
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., e Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, *126*(1), 131–138. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X)
- Grotto, H. Z. W. (2008). Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. *Revista Brasileira de Hematologia E Hemoterapia*, *30*(5). <https://doi.org/10.1590/s1516-84842008000500012>

- Gundlach, H., Müller, M. J., Kutchan, T. M., e Zenk, M. H. (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(6), 2389–2393. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.6.2389>
- Hajiaghaalipour, F., Khalilpourfarshbafi, M., Arya, A., e Arya, A. (2015). Modulation of glucose transporter protein by dietary flavonoids in type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Biological Sciences*, 11(5), 508–524. <https://doi.org/10.7150/ijbs.11241>
- Halliwell, B., e Gutteridge, J. M. C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology*, 186(C), 1–85. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86093-B](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86093-B)
- Halliwell, B., e Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 231–255. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>
- Hamada, T., White, Y., Nakashima, M., Oiso, Y., Fujita, M. J., Okamura, H., ... Arima, N. (2012). The bioassay-guided isolation of growth inhibitors of adult T-cell leukemia (ATL), from the jamaican plant *Hyptis verticillata*, and NMR characterization of hyptoside. *Molecules*, 17(8), 9931–9938. <https://doi.org/10.3390/molecules17089931>
- Hämäläinen, M., Lilja, R., Kankaanranta, H., e Moilanen, E. (2008). Inhibition of iNOS expression and NO production by anti-inflammatory steroids. Reversal by histone deacetylase inhibitors. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 21, 331–339. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2007.08.003>
- Hanganu, D., Vlase, L., e Olah, N. (2010). Phytochemical analysis of isoflavons from some Fabaceae species extracts. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(1), 57–60. <https://doi.org/10.5194/tc-6-713-2012>
- Harb, T. B., Torres, P. B., Pires, J. S., Santos, D. Y. A. C., e Chow, F. (2016). Ensaio do potencial antioxidante de extratos de algas através do sequestro do ABTS•+ em microplaca. *Instituto de Biotecnologia, Universidade de São Paulo*, 1–4.
- Hari, I., e Mathew, N. (2018). Larvicidal activity of selected plant extracts and their combination against the mosquito vectors *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(9), 9176–9185. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1515-3>
- Harley, R. M. (1988). Revision of generic limits in *Hyptis* Jacq. (Labiatae) and its allies. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 98(2), 87–95. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1988.tb01697.x>
- Harley, R.M., Atkins, S., Budantsev, A.L., Cantino, P.D., Conn, B.J., Grayer, R., Harley, M.M., de Kok, R., Krestovskaya, T., Morales, R., Paton, A.J., Ryding, O., Upson, T. (2004). Labiatae. In: Kubitzki JW, ed. The Families and Genera of Vascular Plants 7. Flowering Plants. *Dicotyledons. Lamiales (Except Acanthaceae including Avicenniaceae)*, 167-275.
- Hasimoto E Souza, L. K., Alves De Oliveira, C. M., Henrique Ferri, P., Costa Santos, S., De Oliveira, J. G., Borges Miranda, A. T., ... Rodrigues Silva, M. D. R. (2002). Antifungal properties of Brazilian cerrado plants. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(3), 247–249. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822002000300012>

- Hayashi, H., Huang, P., e Inoue, K. (2003). Up-regulation of Soyasaponin Biosynthesis by Methyl Jasmonate in Cultured Cells of *Glycyrrhiza glabra*. *Plant Cell Physiol*, 44(4), 404–411.
- Henriques, M. das G. M. de, e Sampaio, A. L. F. (2002). Alternativas para animais de laboratório: sistema in vitro. In A. Andrade, S. C. Pinto, e R. S. Oliveira (Eds.), *Animais de laboratório: criação e experimentação* (p. 388). Rio de Janeiro: Fiocruz.
- Hossan, S., Rahman, S., Bashar, A. A., Jahan, R., Al-Nahain, A., e Rahmatullah, M. (2014). Rosmarinic acid: A review of its anticancer action. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(9), 57–70. <https://doi.org/10.1007/s00390-006-0657-6>
- Husein, A. I., Jondi, W. J., Zatar, N. A., e Ali-Shtayeh, M. S. (2014). Synthesis and biological evaluation of novel mono acid esters derived from the constituents of *Urtica pilulifera*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(4), 1173–1181.
- Huyut, Z., Beydemir, Ş., e Gülçin, I. (2017). Antioxidant and antiradical properties of selected flavonoids and phenolic compounds. *Biochemistry Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7616791>
- Hwang, J. S., Kwon, M. Y., Kim, K. H., Lee, Y., Lyoo, I. K., Kim, J. E., ... Han, I. O. (2017). Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated iNOS induction is increased by glucosamine under normal glucose conditions but is inhibited by glucosamine under high glucose conditions in macrophage cells. *Journal of Biological Chemistry*, 292(5), 1724–1736. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.737940>
- Ilboudo, Z., Dabiré, L. C. B., Nébié, R. C. H., Dicko, I. O., Dugravot, S., Cortesero, A. M., e Sanon, A. (2010). Biological activity and persistence of four essential oils towards the main pest of stored cowpeas, *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 46(2), 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2009.12.002>
- Iloba, B. N., e Ekraene, T. (2006). Daily mortality responses of *Callosobruchus maculatus* and *Sitophilus zeamais* to changes in the concentrations of *Azadirachta indica*, *Ocimum gratissimum* and *Hyptis suaveolens*. *Journal of Entomology*. <https://doi.org/10.3923/je.2006.271.276an>
- Isobe, T., Doe, M., Morimoto, Y., Nagata, K., e Ohsaki, A. (2006). The anti-*Helicobacter pylori* flavones in a Brazilian plant, *Hyptis fasciculata*, and the activity of methoxyflavones. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29(5), 1039–41. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.1039>
- Ito, N., e Hirose, M. (1989). Antioxidants. Carcinogenic and chemopreventive properties. *Advances in Cancer Research*, 53, 247–302. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227555-1/00502-5>
- Ivanauskas, L., Jakštas, V., Radušienė, J., Lukošius, A., e Baranauskas, A. (2008). Evaluation of phenolic acids and phenylpropanoids in the crude drugs. *Medicina*, 44(1), 48–55.
- Iwu, M., Ezeugwu, C., Okunji, C., Sanson, D. R., e Tempesta, M. S. (1990). Antimicrobial activity and terpenoids of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Pharmaceutical Biology*, 28(1), 73–76. <https://doi.org/10.3109/13880209009082783>

- Jantan, I., Bukhari, S. N. A., Mohamed, M. A. S., Wai, L. K., e Mesaik, M. A. (2015). The evolving role of natural products from the tropical rainforests as a replenishable source of new drug leads. In *Drug Discovery and Development - From Molecules to Medicine* (Vol. 2, p. 64). <https://doi.org/10.5772/59603>
- Jaya, S., Prakash, B., e Dubey, N. K. (2011). Evaluation of chemically characterised essential oils of *Coleus aromaticus*, *Hyptis suaveolens* and *Ageratum conyzoides* against storage fungi and aflatoxin contamination of food commodities. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(4), 754–760. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02557.x>
- Jaya, Singh, P., Prakash, B., e Dubey, N. K. (2014). Insecticidal activity of *ageratum conyzoides* L., *coleus aromaticus* benth. And *Hyptis suaveolens* (L.) poit essential oils as fumigant against storage grain insect *Tribolium castaneum* herbst. *Journal of Food Science and Technology*, 51(9), 2210–2215. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0698-8>
- Jeganathan, B., Punyasiri, P. A. N., Kottawa-Arachchi, J. D., Ranatunga, M. A. B., Abeysinghe, I. S. B., Gunasekare, M. T. K., e Bandara, B. M. R. (2016). Genetic variation of flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in the Sri Lankan tea (*Camellia sinensis* L.) and their health-promoting aspects. *International Journal of Food Science*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6057434>
- Jeong, J. W., Lee, W. S., Shin, S. C., Kim, G. Y., Choi, B. T., e Choi, Y. H. (2013). Anthocyanins downregulate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in BV2 microglial cells by suppressing the NF- κ B and Akt/MAPKs signaling pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(1), 1502–1515. <https://doi.org/10.3390/ijms14011502>
- Jesus, A. S., Blank, A. F., Alves, M. F., Arrigoni-Blank, M. F., Lima, R. N., e Alves, P. B. (2016). Influence of storage time and temperature on the chemical composition of the essential oil of *Hyptis pectinata* L. Poit. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 18(1), 336–340. https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_177
- Jesus, N. Z. T., Falcão, H. S., Lima, G. R. M., Caldas Filho, M. R. D., Sales, I. R. P., Gomes, I. F., ... Batista, L. M. (2013). *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae), a medicinal plant protects the stomach against several gastric ulcer models. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(3), 982–988. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.010>
- Jiang, B., e Zhang, Z. W. (2012). Comparison on phenolic compounds and antioxidant properties of cabernet sauvignon and merlot wines from four wine grape-growing regions in China. *Molecules*, 17(8), 8804–8821. <https://doi.org/10.3390/molecules17088804>
- Joly, A.B. (1998). *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. Editora Nacional, São Paulo. 777p.
- Joy, B., Omanakutty, M., e Mathew, M. (2008). Antibacterial Effects and Chemical Composition of the Essential Oil of *Hyptis suaveolens* Poit Leaves. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11(4), 384–390. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2008.10643644>
- Jun, W. J., Han, B. K., Yu, K. W., Kim, M. S., Chang, I. S., Kim, H. Y., e Cho, H. Y. (2001). Antioxidant effects of *Origanum majorana* L. on superoxide anion radicals. *Food Chemistry*, 75, 439–444. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00233-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00233-3)

- Justo, O. R., Moraes, Â. M., Barreto, G. P. D. M., Mercadante, A. Z., e Rosa, P. D. T. V. (2008). Evaluation of the antioxidant potential of plant extracts obtained by supercritical fluid extraction. *Quimica Nova*, 31(7). <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700019>
- Kauss, H., Krause, K., e Jeblick, W. (1992). Methyl jasmonate conditions parsley suspension cells for increased elicitation of phenylpropanoid defense responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 189(1), 304–308.
- Kedare, S. B., e Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>
- Kerdudo, A., Ellong, E. N., Gonnot, V., Boyer, L., Michel, T., Adenet, S., ... Adenet, S. (2016). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Hyptis atrorubens* Poit. from Martinique (F . W . I .). *Journal of Essential Oil Research*, 2905(March), 436–444. <https://doi.org/10.1080/10412905.2016.1150217>
- Ketchum, R. E. B., Gibson, D. M., Croteau, R. B., e Shuler, M. L. (1999). The Kinetics of Taxoid Accumulation in Cell Suspension Cultures of *Taxus* Following Elicitation With Methyl Jasmonate. *Biotechnology and Bioengineering*, 62, 97–105.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., e Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328–2375. <https://doi.org/10.3390/molecules18022328>
- Khonkarn, R., Okonogi, S., Kittipongpatana, O. S., e Boasoung, V. (2015). Antifungal effect of *Hyptis suaveolens* oil microemulsion based carboxymethyl mungbean gel for topical delivery. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(9), 262–267.
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., e Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, 61(1), 1361779. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>
- Khoury, M., Stien, D., Eparvier, V., Ouaini, N., e El Beyrouthy, M. (2016). Report on the Medicinal Use of Eleven Lamiaceae Species in Lebanon and Rationalization of Their Antimicrobial Potential by Examination of the Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Their Essential Oils. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2547169>
- Kim, K. W., e Jin, Y. (2015). Neuronal responses to stress and injury in *C. elegans*. *FEBS Letters*. <https://doi.org/10.1002/stem.1868>. Human
- Kim, S. J., Ha, M. S., Choi, E. Y., Choi, J. II, e Choi, I. S. (2005). Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression induced by *Prevotella nigrescens* lipopolysaccharide. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 43(1), 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.femsim.2004.07.001>
- Kini, F., Kam, B., Aycard, J. P., Gaydou, E. M., e Bombarda, I. (1993). Chemical composition of the essential oil of *Hyptis spicigera* Lam. From Burkina Faso. *Journal of Essential Oil Research*, 5(2), 219–221. <https://doi.org/10.1080/10412905.1993.9698206>

- Kivrak, Ş., Göktürk, T., Kivrak, İ., Kaya, E., e Karababa, E. (2019). Investigation of phenolic profiles and antioxidant activities of some *Salvia* species commonly grown in Southwest Anatolia using UPLC-ESI-MS/MS. *Food Science and Technology*, 39(2), 423–431. <https://doi.org/10.1590/fst.32017>
- Klaumann, P. R., Wouk, A. F. P. F., e Sillas, T. (2008). Patofisiologia da dor. *Archives of Veterinary Science*, 13(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2013.05.003>
- Koba, K., Raynaud, C., Millet, J., Chaumont, J. P., e Sanda, K. (2007). Chemical Composition of *Hyptis pectinata* L., *H. lanceolata* Poit., *H. suaveolens* (L) Poit. and *H. spicigera* Lam. Essential Oils from Togo. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 10(5), 357–364. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2007.10643567>
- Končić, M. Z., Barbarić, M., Perković, I., e Zorc, B. (2011). Antiradical, chelating and antioxidant activities of hydroxamic acids and hydroxyureas. *Molecules*, 16(8), 6232–6242. <https://doi.org/10.3390/molecules16086232>
- Kong, K. W., Mat-Junit, S., Aminudin, N., Hassan, F. A., Ismail, A., e Abdul Aziz, A. (2016). Protective effects of the extracts of *Barringtonia racemosa* shoots against oxidative damage in HepG2 cells. *PeerJ*, 4, e1628. <https://doi.org/10.7717/peerj.1628>
- Konuklugil, B. (1996). Investigation of podophyllotoxin in some plants in Lamiaceae using HPLC. *Journal Fac. Pharma Ankarla* 25, 1.
- Kossouh, C., Moudachirou, K., Chalchat, J. C., e Figuéredo, G. (2010). A comparative study of the chemical composition of the leaves and fruits deriving the essential oil of *Hyptis suaveolens* (L.) poit. From Benin. *Journal of Essential Oil Research*, 22(6), 507–509. <https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700384>
- Kothandan, S., e Swaminathan, R. (2014). Evaluation of in vitro antiviral activity of *Vitex Negundo* L., *Hyptis suaveolens* (L) poit., *Decalepis hamiltonii* Wight e Arn., to Chikungunya virus. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(S1), S111–S115. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60424-2](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60424-2)
- Kouninki, H., Haubruge, E., Noudjou, F. E., Lognay, G., Malaisse, F., Ngassoum, M. B., ... Hance, T. (2005). Potential use of essential oils from Cameroon applied as fumigant or contact insecticides against *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 70(4), 787–792. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16628918
- Kovendan, K., Murugan, K., Panneerselvam, C., Kumar, P. M., Amerasan, D., Subramaniam, J., ... Barnard, D. R. (2012). Laboratory and field evaluation of medicinal plant extracts against filarial vector, *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 110(6), 2105–2115. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2736-2>
- Kowalczyk, E., Krzesinski, P., Kura, M., Szmigiel, B., e Blaszczyk, J. (2003). Anthocyanins in medicine. *Pol. J. Pharmacol.*, 55, 699–702.

- Kowaltowski, A. J., e Vercesi, A. E. (1999). Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(3–4), 463–471. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00216-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00216-0)
- Krafts, K. P. (2010). The hidden drama Tissue repair, (December), 225–233. <https://doi.org/10.4161/org6.4.12555>
- Kretschmar, F. S., Oliveira, C. J. F., e Braga, M. R. (2007). Differential sugar uptake by cell suspension cultures of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 43(1), 71–78. <https://doi.org/10.1007/s11627-006-9001-x>
- Krishnamurthy, Y. L., e Shashikala, J. (2006). Inhibition of aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus*, isolated from soybean seeds by certain natural plant products. *Letters in Applied Microbiology*, 43(5), 469–474. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02011.x>
- Krishnamurthy, Y. L., Shashikala, J., e Shankar Naik, B. (2008). Antifungal potential of some natural products against *Aspergillus flavus* in soybean seeds during storage. *Journal of Stored Products Research*, 44(4), 305–309. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2008.03.001>
- Krutilla, J. V. (1967). Conservation Reconsidered. *The American Economic Review*. Vol. LVII, n. 4, p. 777-786.
- Krutilla, J. V.; Fisher, A. C. (1976). The economics of natural environments: studies in the valuation of commodity and amenity resources. Washington DC: *Resources for the Future*. 2.ed.
- Krzyzanowska, J., Czubacka, A., Pecio, L., Przybys, M., Doroszewska, T., Stochmal, A., e Oleszek, W. (2011). The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in *Mentha × piperita* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, (January). <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0014-8>
- Kuete, V. (2010). Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: A review. *Planta Medica*, 76(14), 1479–1491. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250027>
- Kuete, V., Seo, E. J., Krusche, B., Oswald, M., Wiench, B., Schröder, S., ... Efferth, T. (2013). Cytotoxicity and pharmacogenomics of medicinal plants from traditional Korean medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(341724), 1–14. <https://doi.org/10.1155/2013/341724>
- Kuhnt, M., Probstle, A., Rimpler, H., Bauer, R., e Heinrich, M. (1995). Biological and pharmacological activities and further constituents of *Hyptis verticillata*. *Planta Medica*, 61(3), 227–232. <https://doi.org/10.1055/s-2006-958061>
- Kuhnt, M., Rimpler, H., e Heinrich, M. (1994). Lignans and other compounds from the mixe indian medicinal plant *Hyptis verticillata*. *Phytochemistry*, 36(2), 485–489. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97101-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97101-2)

- Kulbat, K. (2016). Biotechnology and Food Sciences The role of phenolic compounds in plant resistance. *Biotechnol Food Sci*, 80(2), 97–108. Retrieved from <http://www.bfs.p.lodz.pl>
- Kumar, S., e Pandey, A. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 16. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Kumari, K. M. e Padmaja, V. (2012). Evaluation of the total antioxidant capacity of the selected plant extracts using ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. *International Journal of Pharmacological Research*, 2(1), 81–86.
- Kuroyanagi, M., Arakawa, T., Mikami, Y., Yoshida, K., Kawahar, N., Hayashi, T., e Ishimaru, H. (1998). Phytoalexins from Hairy Roots of *Hyoscyamus albus* Treated with Methyl Jasmonate. *Journal of Natural Products*, 1516–1519. <https://doi.org/10.1021/np980214i>
- Kusuma, I. W., Murdiyanto, Arung, E. T., Syafrizal, e Kim, Y. (2014). Antimicrobial and antioxidant properties of medicinal plants used by the Bentian tribe from Indonesia. *Food Science and Human Wellness*, 3(3–4), 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.12.004>
- Ladan, Z., Amupitan, J. O., Okonkwo, E. M., Aimola, I. A., e Habila, N. (2009). Antimicrobial potency of *Hyptis spicigera* leaf extracts against some pathogenic microorganisms. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(11), 902–905. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-73649125316&partnerID=tZ0tx3y1>
- Lamboursain, L., e Jolicoeur, M. (2005). Critical influence of *Eschscholzia californica* cells nutritional state on secondary metabolite production. *Biotechnology and Bioengineering*, 91(7), 827–837. <https://doi.org/10.1002/bit.20553>
- Lattanzio, V. (2013). Phenolic compounds: introduction. In *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6>
- Lavecchia, T., Rea, G., Antonacci, A., e Giardi, M. T. (2013). Healthy and Adverse Effects of Plant-Derived Functional Metabolites: The Need of Revealing their Content and Bioactivity in a Complex Food Matrix. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(2), 198–213. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.520829>
- Leão, L. L., Oliveira, F. S., Souza, R. S., Farias, P. K. S., Fonseca, F. S. A. da, Martins, E. R., e Souza, R. M. de. (2017). Uso de antioxidantes naturais em carnes e seus subprodutos. *Caderno de Ciências Agrárias*, 9(1), 94–100. Retrieved from <https://seer.ufmg.br/index.php/ccaufmg/article/view/4249/3240>
- Lechner, M., Lirk, P., e Rieder, J. (2005). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: The two sides of the same coin. *Seminars in Cancer Biology*, 15(4), 277–289. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.04.004>
- Leclercq, P. A., Delgado, H.S., Garcia, J., Hidalgo, J. E., Cerrutti, T., Mestanza, M., Rios, F., Nina, E., Nonato, L., Alvarado, R., Menéndez, R. (2000). Aromatic Plant Oils of the Peruvian Amazon. Part 2. *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Renealmia* sp., *Hyptis recurvata* Poit. And *Tynanthus panurensis* (Bur.)

- Sandw. *Journal of Essential Oil Research*, 12(1), 14–18. <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9712030>
- Lee, S. R., Kim, M. S., Kim, S., Hwang, K. W., e Park, S. Y. (2017). Constituents from *Scutellaria barbata* Inhibiting Nitric Oxide Production in LPS-Stimulated Microglial Cells. *Chemistry and Biodiversity*, 14(11), 1–9. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700231>
- Leo, C. H., e Woodman, O. L. (2015). Flavonols in the Prevention of Diabetes-induced Vascular Dysfunction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 65(6), 532–544. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000180>
- Li, B., Cantino, P. D., Olmstead, R. G., Bramley, G. L. C., Xiang, C. L., Ma, Z. H., ... Zhang, D. X. (2016). A large-scale chloroplast phylogeny of the Lamiaceae sheds new light on its subfamilial classification. *Scientific Reports*, 6, 1–18. <https://doi.org/10.1038/srep34343>
- Li, L., Gong, X., Ren, H., Wang, X., He, Y., e Dong, Y. (2018). Increased polyphenols and antioxidant activity of rice bean (*Vigna umbellata* L.) sprouts induced by Methyl Jasmonate : the promotion effect of Methyl Jasmonate on rice bean sprouts. *Food Sci. Technol*, 2061, 2–8. <https://doi.org/10.1590/fst.36717>
- Li, X. F., Tang, L., Zheng, N. N., An, S., Wang, Y. X., Zhang, W. X., e Hu, Y. N. (2014). Determination of Antioxidant Activity *In Vitro* from *Hyptis rhomboidea* Mart. et Gal. Ethanol Extracts. *Applied Mechanics and Materials*, 472, 824–828. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.472.824>
- Lila, M. A. (2004). Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach. *Biomedicine and Biotechnology*, 5, 306–313.
- Lim, H. S., Kim, Y. J., Kim, B. Y., Park, G., e Jeong, S. J. (2018). The anti-neuroinflammatory activity of tectorigenin pretreatment via downregulated NF- κ B and ERK/JNK pathways in BV-2 microglial and microglia inactivation in mice with lipopolysaccharide. *Frontiers in Pharmacology*, 9(462), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00462>
- Lima, A. C. B. D., Paixão, M. S., Melo, M., Santana, M. T. D., Damascena, N. P., Dias, A. S., ... Araújo, B. S. (2013). Orofacial antinociceptive effect and antioxidant properties of the hydroethanol extract of *Hyptis fruticosa* salmz ex Benth. *Journal of Ethnopharmacology*, 146(1), 192–197. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.12.031>
- Lima, C. F., Valentao, P. C. R., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Fernandes-Ferreira, M., e Pereira-Wilson, C. (2007). Water and methanolic extracts of *Salvia officinalis* protect HepG2 cells from t-BHP induced oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions*, 167(2), 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.01.020>
- Lima, G. C., Vasconcelos, Y. de A. G., de Santana Souza, M. T., Oliveira, A. S., Bomfim, R. R., de Albuquerque Júnior, R. L. C., ... Diniz, L. R. L. (2018). Hepatoprotective Effect of Essential Oils from *Hyptis crenata* in Sepsis-Induced Liver Dysfunction. *Journal of Medicinal Food*, 0(0), jmf.2017.0125. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0125>

- Lima, S. O., Viana, L. da C., Santana, F. R. T. de, Zucoloto, S., Albuquerque Junior, R. L. de, e Gomes, M. Z. (2012). Proliferative effect of aqueous extract of *Hyptis fructicosa* on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, 27(1), 71–75. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502012000100012>
- Lima, V. L. A. G. de, Pinheiro, I. O., Nascimento, M. S. do, Gomes, P. B., e Guerra, N. B. (2006). Identification of anthocyanidins in acerolas of the Active Germplasm Bank of the Federal Rural University of Pernambuco. *Food Sci. Technol*, 26(4), 927–935. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000400033>
- Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., ... Chen, S. (2016). An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*, 21(10). <https://doi.org/10.3390/molecules21101374>
- Lin, L.-Z., e Harnly, J. (2012). Quantitation of flavanols, proanthocyanidins, isoflavones, flavanones, dihydrochalcones, stilbenes, benzoic acid derivatives using ultraviolet absorbance after identification by liquid chromatography-mass spectrometry. *Agric Food Chem.*, 60(23), 5832–5840. <https://doi.org/10.1021/jf3006905>
- Lisboa, A. C. C. D., Mello, I. C. M., Nunes, R. S., dos Santos, M. A., Antonioli, A. R., Marçal, R. M., e Cavalcanti, S. C. d. H. (2006). Antinociceptive effect of *Hyptis pectinata* leaves extracts. *Fitoterapia*, 77(6), 439–442. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.06.001>
- Liu, H. K., Kang, Y., Zhao, X. Y., Liu, Y., Zhang, X. W., e Zhang, S. (2019). Effects of elicitation on bioactive compounds and biological activities of sprouts. *Journal of Functional Foods*, 53(13), 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.12.019>
- Liu, H. L., Kao, T. H., Shiau, C. Y., e Chen, B. H. (2018). Functional components in *Scutellaria barbata* D. Don with anti-inflammatory activity on RAW 264.7 cells. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(1), 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.11.022>
- Liu, J., Abate, W., Jinsheng Xu, Corry, D., Kaul, B., e Jackson, S. K. (2010). Three-dimensional spheroid cultures of A549 and HepG2 cells exhibit different lipopolysaccharide (LPS) receptor expression and LPS-induced cytokine response compared with monolayer cultures. *Innate Immunity*, 17(3), 245–255. <https://doi.org/10.1177/1753425910365733>
- Livermore, D. M. (2004). The need for new antibiotics. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1465-0691.2004.1004.x>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., e Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Lohani, H., Andola, H. C., e Chauhan, N. (2011). Variations in essential oil composition and biological activity of *Hyptis suaveolens* Poit: A high value aromatic plant of the Himalaya. *Medicinal Plants - International Journal of Phytomedicines and Related Industries*, 3(4), 311. <https://doi.org/10.5958/j.0975-4261.3.4.052>

- Lopez, A. G., Banchio, E., Zygadlo, J. A. (2002). Aromatic Plants of Yungas Part I: Chemical Composition of the Essential Oil of *Hyptis floribunda* Briq. Ex. Micheli. *Journal of Essential Oil Research*, v. 14. <https://doi.org/10.1080/10412905.2002.9699816>
- Lutterbach, R., e Stöckigt, J. (1994). In vivo investigation of plant-cell metabolism by means of natural-abundance ^{13}C -NMR Spectroscopy. *Helvetica Chimica Acta*, 77.
- Luz, R., Zoghbi, M. G. B., Silva, M. L., Ramos, L. S., e Hyptáa, D. (1989). Variedades químicas de *Hyptis mutabilis*. *Acta*, 19, 365–370.
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., e Lima, J. L. F. C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613(1), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.02.047>
- Maia, R. M., Moura, C. W. N., Bispo, V. S., Santos, J. L. A., Santana, R. S., e Matos, H. R. (2010). Avaliação do sequestro do óxido nítrico (NO) pelo extrato metanólico da alga *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) Howe. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20(4), 489–493. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000400005>
- Maisuthisakul, P., Suttajit, M., e Pongsawatmanit, R. (2007). Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry*, 100(4), 1409–1418. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.032>
- Malan, K., Pelissier, Y., Marion, C., Blaise, A., e Bessiere, J. M. (1988). The essential oil of *Hyptis pectinata*. *Planta Medica*, 54(6), 531–532. <https://doi.org/10.1055/s-2006-962540>
- Malele, R. S., Mutayabarwa, C. K., Mwangi, J. W., Thoithi, G. N., Mutayabarwa, C. K., Lucini, E. I., e Zygadlo, J. A. (2003). Essential Oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. from Tanzania: Composition and Antifungal Activity. *Journal of Essential Oil Research*, 15(6), 438–440. <https://doi.org/10.1080/10412905.2003.9698633>
- Mallavarapu, G. R., Ramesh, S., Kaul, P. N., Bhattacharya, A. K., e Rajeswara Rao, B. R. (1993). The essential oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. *Journal of Essential Oil Research*, 5(3), 321–323. <https://doi.org/10.1080/10412905.1993.9698230>
- Mamta, Mirsa, K., Dhillon, G. S., Brar, S. K. e Verma, M. (2013). Part II. Bioactive secondary metabolites. Chapter 6. Antioxidant. In S. K. Brar, G. S. Dhillon, e C. R. Soccol (Eds.), *Biotransformation of waste biomass into high value biochemicals* (pp. 117–138). New York: Springer. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8005-1>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C, Rémésy, C. e Jiménez, L. (2004). Polyphenols : food sources and bioavailability . *Am J Clin Nutr. American Journal of Clinical Nutrition*, 79(October 2015), 727–747. <https://doi.org/10.1038/nature05488>
- Mandal, S. M. Mondal, K. C., Dey, S. and Pati, B. R. (2007). Antimicrobial Activity of the Leaf Extracts of *Hyptis suaveolens* (L .) Poit. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, (August), 1–2.

- Maqsood, M., Qureshi, R., Ikram, M., Ahmad, M. S., Jabeen, B., Asi, M. R., ... Lilge, L. (2018). In vitro anticancer activities of *Withania coagulans* against HeLa, MCF-7, RD, RG2, and INS-1 cancer cells and phytochemical analysis. *Integrative Medicine Research*, 7(2), 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2018.03.003>
- Maridass, M., e Britto, A. J. (2008). Origins of Plant Derived Medicines. *Ethnobotanical Leaflets*, 12, 373–387.
- Martins, F. T., Dos Santos, M. H., Polo, M., e Barbosa, L. C. D. A. (2006). Variação química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) poit., sob condições de cultivo. *Química Nova*, 29(6), 1203–1209. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600011>
- Martins, F. T., Santos, M. H., Polo, M., e Barbosa, L. C. A. (2007). Effects of the interactions among macronutrients, plant age and photoperiod in the composition of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit essential oil from Alfenas (MG), Brasil. *Flavour and Fragrance Journal*, 22(November), 123–129. <https://doi.org/10.1002/ffj.1769>
- Matkowski, A. (2008). Plant in vitro culture for the production of antioxidants - A review. *Biotechnology Advances*, 26(6), 548–560. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.001>
- Matsuse, I. T., Lim, Y. A., Hattori, M., Correa, M., e Gupta, M. P. (1999). A search for anti-viral properties in Panamanian medicinal plants. The effects on HIV and its essential enzymes. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(1), 15–22. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00099-3)
- McLaughlin, J.L.; Chang, C.J.; Smith, D.L. (1991). "Bench-top" bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update, p. 383-409. In: Rahman, A. (Org.). *Studies in Natural Product Chemistry*, 9th ed., Elsevier, Amsterdam.
- Mekinić, I. G., Skroza, D., Ljubenković, I., Šimat, V., Možina, S. S., e Katalinić, V. (2014). In vitro antioxidant and antibacterial activity of Lamiaceae phenolic extracts: a correlation study. *Food Technology and Biotechnology*, 52(1), 119–127.
- Melo, G. B. de, Silva, R. L., Antonioli, A. R., Melo, V. A. de, Lima, S. O., Silva, P. M. da, e Silva Jr., O. de C.. (2001). Efeitos do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* sobre a regeneração hepática após hepatectomia parcial de 70%: resultados preliminares. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 16(Suppl. 1), 13-15. <https://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502001000500005>
- Melo, G. B., Lemos Silva, R., Melo, V. A., Antonioli, Â. R., Roberto, P., Michellone, T., ... De Castro-E-Silva, O. (2006). Proliferative effect of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira -Vol Planta. Melo GB et alActa Cirúrgica Brasileira*, 21(21), 33–36.
- Melo, G. B., Silva, R. L., Melo, V. A., Lima, S. O., Antonioli, Â. R., Castro-E-Silva, T., ... Castro-E-Silva, O. (2005). Enhancement of liver regeneration by the association of *Hyptis pectinata* with laser therapy. *Digestive Diseases and Sciences*, 50(5), 949–954. <https://doi.org/10.1007/s10620-005-2670-1>

- Mendoza, D., Cuaspuud, O., Arias, J. P., Ruiz, O., e Arias, M. (2018). Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *Biotechnology Reports*, *19*(63), e00273. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00273>
- Menezes, I. A. C., Marques, M. S., Santos, T. C., Dias, K. S., Silva, A. B. L., Mello, I. C. M., ... Antonioli, A. R. (2007). Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis fruticosa* in mice. *Fitoterapia*, *78*(3), 192–195. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.11.020>
- Michalak, a. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Plant Cell*, *15*(4), 523–530. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>
- Miguel, M. G. (2011). Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *1*(6), 7–15.
- Miranda, E. S., Ramos, J. P., Orozco, C. F., Angel, M., Sánchez, Z., e Gutiérrez, S. P. (2013). Anti-Inflammatory Effects of *Hyptis albida* Chloroform Extract on Lipopolysaccharide-Stimulated Peritoneal Macrophages, *2013*(Splm 20419).
- Mishra, S. B., Verma, A., Mukerjee, A., e Vijayakumar, M. (2011). Anti-hyperglycemic activity of leaves extract of *Hyptis suaveolens* L . Poit in streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *4*(9), 689–693. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60175-2](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60175-2)
- Mizukami, H., Ogawa, T., Ohashi, H., e Ellis, B. E. (1992). Induction of rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures by yeast extract. *Plant Cell Reports*, *11*(9), 480–483. <https://doi.org/10.1007/BF00232695>
- Mizukami, H., Tabira, Y., e Ellis, B. E. (1993). Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, *12*(12), 706–709. <https://doi.org/10.1007/BF00233424>
- Mohan, N., Jassal, P. S., Kumar, V., e Singh, R. P. (2011). Comparative In vitro and In vivo study of antioxidants and phytochemical content in *Bacopa monnieri*. *Recent Research in Science and Technology*, *3*(9), 78–83.
- Moreira, A.C.P., Lima, E.O., Wanderley, P. A., Carmo, E.S., Souza, E.L. (2010a). Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, *41*: 28-33 ISSN 1517-8382
- Moreira, Í. J. A., Moreno, M. P. N., Fernandes, M. F. G., Fernandes, J. B., Moreira, F. V., Antonioli, Â. R., e Santos, M. R. V. (2010b). Vasorelaxant effect of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae, dichloromethane extract on rat mesenteric artery. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *20*(5), 762–765. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000003>
- Mucciarelli, M., Berteza, C. M., e Camusso, W. (2009). Sugar metabolism of *Vetiveria zizanioides* cells cultured with Amberlite XAD-4. Uptake of radiolabelled sugars, cell wall invertase activity and gene expression. *Journal of Plant Interactions*, *4*(1), 23–31. <https://doi.org/10.1080/17429140802372798>

- Mueller, M., Čavarkapa, A., Unger, F. M., Viernstein, H., e Praznik, W. (2016). Prebiotic potential of neutral oligo- and polysaccharides from seed mucilage of *Hyptis suaveolens*. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.075>
- Munita, J. M., e Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*, *4*(2), 1–37. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.Mechanisms>
- Muthamil, S., Devi, V. A., Balasubramaniam, B., Balamurugan, K., e Pandian, S. K. (2018). Green synthesized silver nanoparticles demonstrating enhanced in vitro and in vivo antibiofilm activity against *Candida* spp. *Journal of Basic Microbiology*, *58*(4), 343–357. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700529>
- Nafie, E., Hathout, T., Shyma, A., e Mokadem, A. (2011). Jasmonic acid elicits oxidative defense and detoxification systems in *Cucumis melo* L. cells, *23*(2), 161–174. <https://doi.org/00.0000/S00000-000-0000-0>
- Namdeo, A. G. (2007). Phcog Rev.: Review Article Precursor feeding for enhanced production of Secondary metabolites: A review. *Pharmacognosy Reviews*, *1*(1), 69–79.
- Nantitanon W., chowwanapoonpoh S., O. S. (2007). Antioxydant and antimicrobial acitivities of *Hyptis suaveolens* essential oil. *Scientia Pharmaceutica*, *46*, 35–46.
- Nascimento, P. F. C., Alviano, W. S., Nascimento, A. L. C., Santos, P. O., Arrigoni-Blank, M. F., De Jesus, R. A., Azevedo, V.G., Alviano, D.S., Bolognese, A.M., Trindade, R.C. (2008). *Hyptis pectinata* essential oil: Chemical composition and anti-*Streptococcus mutans* activity. *Oral Diseases*, *14*(6), 485–489. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2007.01405.x>
- Nayak, P., Kar, D. M., e Nayak, S. (2014). *In vitro* amylase inhibition and antioxidant potential of chloroform fraction of hydroalcoholic extract obtained from *Hyptis suaveolens*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *4*(9), 46–51. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2014.40908>
- Nepomuceno, C. F., Fonseca, P. T., Silva, T. S., Oliveira, L. M., e Santana, J. R. F. (2014). Germinação in vitro de *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth. e *Hyptis platanifolia* Mart. ex Benth. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 886–895. https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_093
- Newman, D. J. (2017). The influence of Brazilian biodiversity on searching for human use pharmaceuticals. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *28*(3), 402–414. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20160225>
- Ngassoum, M. B., Jirovetz, L., Buchbauer, G. (1999). Essential Oil and Headspace from *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. Leaves and Flowers from Cameroon, *Journal of Essential Oil Research*, *11*:3, 283–288. doi:10.1080/10412905.1999.9701135
- Nicholas, C., Batra, S., Vargo, M. A., Voss, O. H., Gavrilin, M. A., Wewers, M. D., ... Doseff, A. I. (2007). Apigenin Blocks Lipopolysaccharide-Induced Lethality In Vivo and Proinflammatory Cytokines Expression by Inactivating NF- κ B through the Suppression of p65 Phosphorylation. *The Journal of Immunology*, *179*(10), 7121–7127. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.10.7121>

- Nickavar, B., Rezaee, J., e Nickavar, A. (2016). Effect-directed analysis for the antioxidant compound in *Salvia verticillata*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 15(1), 241–246. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2016.1793>
- Nita, M., e Grzybowski, A. (2016). The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3164734> LK
- Noudjou, F., Kouninki, H., Ngamo, L. S. T., Maponmestsem, P. M., Ngassoum, M., Hance, T., ... Lognay, G. C. (2007). Effect of site location and collecting period on the chemical composition of *hyptis spicigera* lam. An insecticidal essential oil from north-Cameroon. *Journal of Essential Oil Research*, 19(6), 597–601. <https://doi.org/10.1080/10412905.2007.9699340>
- Novaes, R. D., Gonçalves, R. V., Cupertino, M. C., Santos, E. C., Bigonha, S. M., Fernandes, G. J. M., ... Natali, A. J. (2016). Acute paraquat exposure determines dose-dependent oxidative injury of multiple organs and metabolic dysfunction in rats: impact on exercise tolerance. *International Journal of Experimental Pathology*, 97(2), 114–124. <https://doi.org/10.1111/iep.12183>
- Nowak, D., Gośliński, M., Wojtowicz, E., e Przygoński, K. (2018). Antioxidant Properties and Phenolic Compounds of Vitamin C-Rich Juices. *Journal of Food Science*, 83(8), 2237–2246. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14284>
- O'Connell, J. E., e Fox, P. F. (2001). Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: A review. *International Dairy Journal*, 11(3), 103–120. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00033-4)
- Ogunbinu, A. O., Okeniyi, S. O., Flamini, G., Cioni, P. L., Ogunwande, I. A., Olayinka, E. T. (2009). Essential Oil-Bearing Plants from Nigeria: Studies on *Vernonia perrottettii* (Leaf and Stem Bark), Young Leaves from *Eucalyptus decaisneana* and Immature Leaves of *Hyptis suaveolens*. *Journal of Essential Oil Research*, 21:2, 154-158. Doi:10.1080/10412905.2009.9700137
- Okonogi, S., Chansakaow, S., Vejabhikul, S., Chuamanochan, V., Lerphokanont, J., Tharavichitkul, P., ... Ikegami, F. (2005). Antimicrobial activity and pharmaceutical development of essential oil from *Hyptis suaveolens*. *Acta Horticulturae*, 678 (December 2001), 163–169. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.678.23>
- Oliva, M.M., Demo, M.S., Lopez, A.G, Zydlo, J.A. (2005). Antimicrobial Activity and Composition of *Hyptis mutabilis* Essential Oil. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 11:4, 57-63, doi: 10.1300/J044v11n04_07
- Oliveira, A. D. L., Rodrigue, F. F. G., Coutinho, H. D. M., da Costa, J. G. M., e de Menezes, I. R. A. (2014a). Chemical composition, modulatory bacterial resistance and antimicrobial activity of essential oil the *Hyptis martiusii* Benth by direct and gaseous contact. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 9(3).

- Oliveira, C. M. A., Silva, M. D. R. R., Kato, L., Da Silva, C. C., Ferreira, H. D., e Souza, L. K. H. (2004). Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15(5), 756–759. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532004000500023>
- Oliveira, G. L. S. (2015). Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do dpph•: Estudo de revisão. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 17(1), 36–44. https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_165
- Oliveira, J., Campos, I. F. P., Oliveira, C. B. A., Santos, M. R., Souza, P. S., e Santos, S. C. (2005). Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptis suaveolens*, 33, 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2004.10.001>
- Oliveira, L. de L., Carvalho, M. V., e Melo, L. (2014b). Health promoting and sensory properties of phenolic compounds in food. *Rev. Ceres*, 764–779. <https://doi.org/10.1590/0034-737x201461000002>
- Oliveira, U., Soares-Filho, B. S., Paglia, A. P., Brescovit, A. D., De Carvalho, C. J. B., Silva, D. P., ... Santos, A. J. (2017). Biodiversity conservation gaps in the Brazilian protected areas. *Scientific Reports*, 7 (1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08707-2>
- Olotuah, O. F. (2013). Laboratory evaluation of pesticidal activities of *Hyptis suaveolens* in pest management. *International Journal of Agricultura Research*, 8(2), 101–106. Doi: 10.3923/ijar.2013.101.106.
- Orłowska, M., Kowalska, T., Sajewicz, M., Pytlakowska, K., Bartoszek, M., Polak, J., e Waksmundzka-Hajnos, M. (2015). Antioxidant activity of selected thyme (*Thymus L.*) species and study of the equivalence of different measuring methodologies. *Journal of AOAC International*, 98(4), 876–882. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.SGE6-Orłowska>
- Othira, J. O., Onek, L. A., Deng, L. A., e Omolo, E. (2009). Insecticidal Potency of *Hyptis Spicigera* Preparations against *Sitophilus Zeamais* (L.) and *Tribolium castaneum* (herbst) on Stored Maize Grains. *African Journal of Agricultural Research*, 4 (3), 187–192.
- Pacher, P., Beckman, J. S., e Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, 87(1), 315–424. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>
- Padilla-Gonzalez, G. F., Santos, F. A. E Costa, F. B. (2016). Sesquiterpene lactones: more than protective plant compounds with high toxicity, *Critical Reviews in Plant Sciences*, doi: 10.1080/07352689.2016.1145956
- Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S., e Bansal, Y. K. (2015). Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9(3), 293–304.
- Paixão, M. S., Melo, M. S., Oliveira, M. G. B., Santana, M. T., Lima, A. C. B., Damascena, N. P., ... Quintans-Júnior, L. J. (2013). *Hyptis pectinata*: Redox protection and orofacial antinociception. *Phytotherapy Research*, 27(9), 1328–1333. <https://doi.org/10.1002/ptr.4869>

- Pålsson, K. e Jaenson, T. G. T. (1999). Plant products used as mosquito repellents in Guinea Bissau, West África. *Acta Tropica*, 72, 39–52. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0001-706X\(98\)00083-7](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0001-706X(98)00083-7)
- Pan, S. Y., Zhou, S. F., Gao, S. H., Yu, Z. L., Zhang, S. F., Tang, M. K., Sun, J.N., Ma, D.L., Han, Y.F., Fong, W. F., Ko, K. M. (2013). New perspectives on how to discover drugs from herbal medicines: CAM'S outstanding contribution to modern therapeutics. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/627375>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., e Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Pandey, V. N., e Dubey, N. K. (1994). Antifungal potential of leaves and essential oils from higher plants against soil phytopathogens. *Soil Biol. Biochem.*, 26(94), 1417–1421. [https://doi.org/0038-0717\(94\)E0065-8](https://doi.org/0038-0717(94)E0065-8).
- Pandit, A., Sachdeva, T., e Bafna, P. (2012). Drug-induced hepatotoxicity: A review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(5), 233–243. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2541>
- Panovska, T. K., Kulevanova, S., e Stefova, M. (2005). In vitro antioxidant activity of some Teucrium species (Lamiaceae). *Acta Pharmaceutica*, 55(2), 207–214.
- Pant, A. K., Singh, A.K., Mathela, C. S., Parihar, R., Dev, V., Nerio, A. T., e Bottini, A. T. (1992). Essential Oil from *Hyptis suaveolens* Poit. *Journal of Essential Oil Research*, 37–41. <https://doi.org/10.1080/10412905.1992.9698003>
- Papuc, C., Predescu, C., Nicorescu, V., Stefan, G., e Nicorescu, I. (2016). Antioxidant properties of a parsley (*Petroselinum crispum*) juice rich in polyphenols and nitrites. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 4(SpecialIssue2), 114–118. <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.4.Special-Issue-October.15>
- Parsaeimehr, A., Sargsyan, E., e Vardanyan, A. (2011). Expression of secondary metabolites in plants and their useful perspective in animal health. *International Journal of the Bioflux Society*, 3(2), 129–134.
- Patel, H., e Krishnamurthy, R. (2013). Elicitors in plant tissue culture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(2).
- Patora, J., e Klimek, B. (2002). Flavonoids from Lemon Balm (*Melissa officinalis* L., Lamiaceae). *Acta Poloniac Pharmaceutica-Drug Research*, 59, 139–143.
- Pavunraj, M., Baskar, K., Paulraj, M. G., Ignacimuthu, S., e Janarthanan, S. (2014). Phagodeterrence and insecticidal activity of *Hyptis suaveolens* (Poit.) against four important lepidopteran pests. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(1), 113–121. <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.800694>

- Pedroso, R. C. N., Branquinho, N. A. A., Hara, A. C. B. M., Costa, A. C., Silva, F. G., Pimenta, L. P., ... Januario, A. H. (2017). Impact of light quality on flavonoid production and growth of *Hyptis marrubioides* seedlings cultivated in vitro. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(4), 466–470. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.12.004>
- Pedroso, R. C. N., Branquinho, N. A. A., Hara, A. C. B. M., Silva, F. G., Filho, L. C. K., Silva, M. L. A., ... Januário, A. H. (2019a). Effect of salicylic acid and silver nitrate on rutin production by *Hyptis marrubioides* cultured in vitro. *Ciência Rural*, 1–5. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180278>
- Pedroso, R. C. N., Pimenta, L. P., Tozatti, M. G., Branquinho, N. A. A., Hara, A. C. B. M., Silva, F. H. L., ... Januario, A. H. (2019b). Effects of Light Quality and Chemical Elicitors on the Growth Parameters and Rosmarinic Acid Content of. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 0(0), 1–8. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190159>
- Peerzada, N., e Territory, N. (1997). Chemical Composition of the Essential Oil of *Hyptis suaveolens*, *Molecules*, 2, 165–168.
- Pereda-Miranda R. (1995) Bioactive Natural Products from Traditionally used Mexican Plants. In: Arnason J.T., Mata R., Romeo J.T. (eds) *Phytochemistry of Medicinal Plants. Recent Advances in Phytochemistry (Proceedings of the Phytochemical Society of North America)*, vol 29. Springer, Boston, MA.
- Pereira, C. A., Vilela, P. G. F., Oliveira, L. D., e Jorge, A. O. C. (2009). Ação antimicrobiana in vitro de extratos glicólicos de *Psidium guajava* L., *Syzygium cumini* L., e *Pimpinella anisum* L. *Revista Do Instituto Adolfo Lutz*, 68(1), 102–108.
- Pham-Huy, L., e He, H. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci*, 4(2), 89–96. Retrieved from <http://www.ijbs.org/User/ContentFullText.aspx?VolumeNO=4e&StartPage=89e>
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., e Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pietschmann, M., Vostrowsky, O., Bestmann, H. J., Anil, K., Mathela, C. S. (1998). Volatile Constituents of *Hyptis pectinata* Poit. (Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 10:5, 550-552, doi: 10.1080/10412905.1998.9700968.
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035–1042. <https://doi.org/10.1021/np9904509>
- Pino, J. A., Marbot, R., Payo, A., Chao, D., Herrera, P., Marti, M. P., ... Herrera, P. (2003). Leaf Oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. from Cuba, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 6:2, 120-126, DOI: 10.1080/0972-060X.2003.10643338
- Porter, R. O. Y. B. R., Reese, P. B., Williams, L. A. D., e Williams, D. J. (1995). Acaricidal and Insecticidal Activities of Cadina-4,10(15)-dien-3-one. *Phytochemistry*, 40(3), 735–738.

- Portu, J., López, R., Santamaría, P., e Garde-Cerdán, T. (2018). Methyl jasmonate treatment to increase grape and wine phenolic content in Tempranillo and Graciano varieties during two growing seasons. *Scientia Horticulturae*, 240(March), 378–386. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.019>
- Predonzani, A., Cali, B., Agnellini, A. H. R., e Molon, B. (2015). Spotlights on immunological effects of reactive nitrogen species: When inflammation says nitric oxide. *World Journal of Experimental Medicine*, 5(2), 64. <https://doi.org/10.5493/wjem.v5.i2.64>
- Prestinaci, F., Pezzotti, P., e Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*, 109(7), 309–318. <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030>
- Prieto, M. A., Rodríguez-Amado, I., Vázquez, J. A., e Murado, M. A. (2012). β -Carotene assay revisited. Application to characterize and quantify antioxidant and prooxidant activities in a microplate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 8983–8993. <https://doi.org/10.1021/jf302218g>
- Pushpangadan, P., George, V., Parambil Ijnu, T., e Ambika Chithra, M. (2018). Biodiversity, Bioprospecting, Traditional Knowledge, Sustainable Development and Value Added Products: A Review. *Journal of Traditional Medicine & Clinical Naturopathy*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.4172/2573-4555.1000256>
- Quintans, J. S. S., Antonioli, Â. R., Almeida, J. R. G. S., Santana-Filho, V. J., e Quintans-Júnior, L. J. (2014). Natural Products Evaluated in Neuropathic Pain Models - A Systematic Review. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 114(6), 442–450. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12178>
- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2(2), 219–236.
- Raja, N., Babu, A., Dorn, S., e Ignacimuthu, S. (2001). Potential of plants for protecting stored pulses from *callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) infestation. *Biological Agriculture and Horticulture*, 19(1), 19–27. <https://doi.org/10.1080/01448765.2001.9754906>
- Ramalho, V. C., e Jorge, N. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, 29(4), 755–760. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000400023>
- Ramos, L. A., Cavalheiro, C. C. S., e Cavalheiro, É. T. G. (2006). Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. *Química Nova*, 29(5), 1114–1120. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000500037>
- Ramu, G., e Dhanabal, S. P. (2015). Antioxidant studies on ethanol extracts from two selected genera of Indian Lamiaceae. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77(6), 780–782. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.174985>
- Rana, V. S., Juyal, J. P., e Blazquez, M. A. (2004). Volatile constituents of *Hyptis suaveolens* flowering twig oil, *The International Journal of Aromatherapy* 14, 198–201. <https://doi.org/10.1016/j.ijat.2004.09.007>

- Ranjbar, A. (2014). Evidence of Oxidative Damage in Paraquat Toxicity. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 16(12), 1–8.
- Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., e Kumar, M. N. V. R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113(3), 189–207. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.015>
- Ray, P. D., Huang, B. W., e Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>
- Raygani, V., Rahimi, Z., Zahraie, M., Noroozian, M., e Pourmotabbed, A. (2007). Enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense in Alzheimer's disease. *Acta Med Iranica*, 45(4), 271–276.
- Raymundo, L. J. R. P., Guilhon, C. C., Alviano, D. S., Matheus, M. E., Antonioli, A. R., Cavalcanti, S. C. H., ... Fernandes, P. D. (2011). Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 134(3), 725–732. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.01.027>
- Raza, H., John, A., e Shafarin, J. (2016). Potentiation of LPS-induced apoptotic cell death in human hepatoma HepG2 cells by aspirin via ROS and mitochondrial dysfunction: Protection by N-acetyl cysteine. *PLoS ONE*, 11(7), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159750>
- Rebelo, M. M., Kelly, R., Andrade, H. a, e Maia, J. G. S. (2009). Antioxidant Capacity and Biological Activity of Essential Oil and Methanol Extract of *Hypis crenata* Pohl Benth. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(1B), 230–235.
- Rehan, T., Tahira, R., Rehan, T., Bibi, A., e Naeemullah, M. (2014). Screening of Seven Medicinal Plants of Family Lamiaceae for Total Phenolics , Screening of Seven Medicinal Plants of Family Lamiaceae for Total Phenolics , *Flavonoids and Antioxidant Activity*, (April).
- Ribeiro, D. A., Macêdo, D. G., Oliveira, L. G. S., Santos, M. O., Almeida, B. V, Loiola, M. I. B., e Souza, M. M. A. (2013). Plantas Medicinais Com Potencial Para Bioprospecção Em Áreas De Cerrado Disjunto Na Chapada Do Araripe, Nordeste Do Brasil. *64º Congresso Nacional de Botânica*, 2013.
- Ricardo, L. M., De Paula-Souza, J., Andrade, A., e Brandão, M. G. L. (2017). Plants from the Brazilian traditional medicine: Species from the books of the polish physician piotr czerniewicz (Pedro Luiz Napoleão Chernoviz, 1812–1881). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 27, 388–400. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.01.002>
- Rijhwani, S. K., e Shanks, J. V. (1998). Effect of subculture cycle on growth and indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* hairy root cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(7), 606–611. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00258-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00258-0)
- Rios, J. L., Giner, R. M., e Prieto, J. M. (2002). New findings on the bioactivity of lignans. *Studies in Natural Products Chemistry*, vol.26.

- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2866–2887. <https://doi.org/10.1021/jf026182t>
- Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. H., e Khalel, K. I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43(1), 827–831. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.029>
- Rocha Caldas, G. F., Oliveira, A. R. D. S., Araújo, A. V., Lafayette, S. S. L., Albuquerque, G. S., Silva-Neto, J. D. C., ... Wanderley, A. G. (2015). Gastroprotective mechanisms of the monoterpene 1,8-cineole (eucalyptol). *PLoS ONE*, 10(8), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134558>
- Rodrigues, A. C., Artioli, F. A., Polo, M., Barbosa, L. C. A., e Beijo, L. A. (2012). Efeito alelopático de folhas de bamburral [*hyptis suaveolens* (L.) poit.] sobre a germinação de sementes de sorgo (*sorghum vulgare* pers.), rabanete (*raphanus sativus* L.) e alface (*lactuca sativa* L.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14(3), 487–493. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000300010>
- Rodrigues, M. A., Bertolucci, S. K. V., Alvarenga, I. C., Silva, S. T., Carvalho, A. A., e Pinto, J. E. B. P. (2019). Cytokinins in the in vitro multiplication and analysis of the volatile. *Revista Ciência Agronômica*, 90–99. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20190011>
- Rodrigues, T. S., Guimarães, S. F., Rodrigues-Das-Dôres, R. G., e Gabriel, J. V. (2011). Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, (SPECIAL ISSUE), 587–590. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000500014>
- Rodrigues, V. E.G. e Carvalho, D.A. (2001). Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio cerrado na região do Alto Rio Grande-Minas Gerais. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v.25, n.1, p.102-123.
- Rodriguez-Mateos, A., Weber, T., Skene, S. S., Ottaviani, J. I., Crozier, A., Kelm, M., e Schroeter, H. (2018). Assessing the respective contributions of dietary flavanol monomers and procyanidins in mediating cardiovascular effects in humans : randomized , controlled , double-masked intervention trial, 1–9.
- Rubio, V., García-Pérez, A. I., Tejedor, M. C., Herráez, A., e Díez, J. C. (2017). Esculetin Neutralises Cytotoxicity of t-BHP but Not of H₂O₂ on Human Leukaemia NB4 Cells. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9491045>
- Russell, R. M., e Paiva, S. A. R. (1999). β -Carotene and other carotenoids as antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, 18(5), 426–433. <https://doi.org/10.1080/07315724.1999.10718880>
- Sá, S. De, Fiuza, T. S., Borges, L. L., Ferreira, H. D., Tresvenzol, L. M. F., Ferri, P. H., ... Paula, J. R. (2016). Chemical composition and seasonal variability of the essential oils of leaves and morphological analysis of *Hyptis carpinifolia*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(6), 688–693. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.05.011>

- Saccaro Junior, N. L. (2011). Desafios da bioprospecção no Brasil. *Texto Para Discussão, N° 1569*. Retrieved from [http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/1568/1/TD_1569 .pdf](http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/1568/1/TD_1569.pdf)
- Saha, R. N., e Pahan, K. (2006a). Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase Gene in Glial Cells. *Antioxidants & Redox Signaling, 8*(5–6), 929–947. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.929>
- Saha, R. N., e Pahan, K. (2006b). Signals for the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. *Neurochemistry International, 49*(2), 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.04.007>
- Sahoo, S., Ghosh, G., Das, D., e Nayak, S. (2013). Phytochemical investigation and in vitro antioxidant activity of an indigenous medicinal plant *Alpinia nigra* B.L. Burtt. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 3*(11), 871–876. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60171-9](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60171-9)
- Sák, M., Dokupilová, I., Mihálik, D., Lakatošová, J., Gubišová, M., e Kraic, J. (2014). Elicitation of phenolic compounds in cell culture of *Vitis vinifera* L. by *Phaeomonilla chlamydozoora*. *Nova Biotechnologica et Chimica, 13*(2), 162–171. <https://doi.org/10.1515/nbec-2015-0006>
- Sakr, H. H., e Roshdy, S. H. (2015). Effect of *Hyptis brevipes* (Lamiaceae) methanol extract on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 6*(6), 651–658.
- Sakr, H. H., Roshdy, S. H., e El-Seedi, H. R. (2013). *Hyptis brevipes* (Lamiaceae) extracts strongly inhibit the growth and development of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Journal of Applied Pharmaceutical Science, 3*(10), 83–88. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.31014>
- Salawu, O. T., Odaibo, e A. B. (2011). The molluscicidal effects of *Hyptis suaveolens* on different stages of *Bulinus globosus* in the laboratory. *African Journal of Biotechnology, 10*(50), 10241–10247. <https://doi.org/10.5897/AJB10.415>
- Sales, J. D. F., Eduardo, J., Pereira, B., Ferri, P. H., e Silva, F. G. (2009). Influência do nível de irradiância no crescimento, produção e composição química do óleo essencial de hortelã-do-campo (*Hyptis marruboides* Epl.). *Semana: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 30, n. 2, p. 389-396.
- Salini, R., Sindhulakshmi, M., Poongothai, T., e Pandian, S. K. (2015). Inhibition of quorum sensing mediated biofilm development and virulence in uropathogens by *Hyptis suaveolens*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology, 107*(4), 1095–1106. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0402-x>
- Sánchez-Sampedro, M. A., Fernández-Tárrago, J., e Corchete, P. (2005). Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Journal of Biotechnology, 119*, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.06.012>
- Sanon, A., Ba, M. N., Dabiré, L. C. B., Nébié, R. C. H., e Monge, J. P. (2011). Side effects of grain protectants on biological control agents: How *Hyptis* plant extracts affect parasitism and larval development of *Dinarmus basalis*. *Phytoparasitica, 39*(3), 215–222. <https://doi.org/10.1007/s12600-011-0162-8>

- Sanon, A., Ilboudo, Z., Dabire, C. L. B., Nebie, R. C. H., Dicko, I. O., e Monge, J. P. (2006). Effects of *Hyptis spicigera* Lam. (Labiatae) on the behaviour and development of *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae), a pest of stored cowpeas. *International Journal of Pest Management*, 52(2), 117–123. <https://doi.org/10.1080/09670870600619890>
- Santos Neto, A. L., Medeiros Filho, S., Fitzgerald Blank, A., Santos, V. R. dos, e Araújo, E. de. (2009). Influência do peso da semente e promotores químicos na qualidade fisiológica de sementes de sambacaitã. *Revista Caatinga*, 187–192.
- Santos, A. K. L., Costa, J. G. M., Menezes, I. R. A., Cansanção, I. F., Santos, K. K. A., Matias, E.F.F., Coutinho, H.D.M. (2010). Antioxidant activity of five Brazilian plants used as traditional medicines and food in Brazil, 335–339. *Pharmacognosy Magazine*, v.6. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.71789>
- Santos, K. K. A., Matias, E. F. F., Sobral-Souza, C. E., Tintino, S. R., Morais-Braga, M. F. B., Guedes, G. M. M., ... Coutinho, H. D. M. (2013). Trypanocide, cytotoxic, and anti-*Candida* activities of natural products: *Hyptis martiusii* Benth. *European Journal of Integrative Medicine*, 5(5), 427–431. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2013.06.001>
- Santos, K.P.S., Sedano-partida, D., Sala-carvalho, W. R., Loureiro B.O.S.J., Silva-luz, C. L., e Furlan, C. M. (2018). Industrial Crops & Products Biological activity of *Hyptis* Jacq. (Lamiaceae) is determined by the environment. *Industrial Crops & Products*, 705–715. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.065>
- Santos, M. R. V., Carvalho, A. A., Medeiros, I. A., Alves, P. B., Marchioro, M., e Antonioli, A. R. (2007b). Cardiovascular effects of *Hyptis fruticosa* essential oil in rats. *Fitoterapia*, 78(3), 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.11.009>
- Santos, P. O., Costa, M. de J. C., Alves, J. A. B., Nascimento, P. F. C., Melo, D. L. F. M. de, Barbosa Jr., A. M., Trindade, R.C., Blank, A.F., Arrigoni-Blank, M.F., Alves, P.B., Nascimento, M. P. F. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. *Química Nova*, 31(7), 1648–1652. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700009>
- Santos, T. C., Marques, M. S., Menezes, I. A. C., Dias, K. S., Silva, A. B. L., Mello, I. C. M., ... Marçal, R. M. (2007a). Antinociceptive effect and acute toxicity of the *Hyptis suaveolens* leaves aqueous extract on mice. *Fitoterapia*, 78(5), 333–336. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.01.006>
- Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., e Mendes Giannini, M. J. S. (2013). *Candida* species : current epidemiology , pathogenicity , biofilm formation , natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 10–24. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0>
- Satdive, R. K., Fulzele, D. P., e Eapen, S. (2007). Enhanced production of azadirachtin by hairy root cultures of *Azadirachta indica* A . Juss by elicitation and media optimization. *Journal of Biotechnology*, 128, 281–289. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.10.009>

- Satish, V., Ravichandrian, V. D., Gavani, U., e Paarakh, P. M. (2010). Antimicrobial studies on the extracts of *Cocculus hirsutus* Linn. and *Hyptis suaveolens* Poit. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 1(1), 49–52.
- Schieber, M., e Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 24(10), R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Schlachetzki, J. C. M., Saliba, S. W., e de Oliveira, A. C. P. (2013). Studying neurodegenerative diseases in culture models. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 35(Suppl 2), 92–100. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1159>
- Schmidt, H. H. H. W., e Walter, U. (1994). NO at work. *Cell*, 78(6), 919–925. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90267-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90267-4)
- Schneider-Müller, S., Kurosaki, F., e Nishi, A. (1994). Role of salicylic acid and intracellular Ca²⁺ in the induction of chitinase activity in carrot suspension culture. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 45, 101–109.
- Scramin, S., Saito, M. L., Pott, A., e Mayo, M. O. (2000). Volatile Constituents of *Hyptis crenata* Pohl (Labiatae) Native in Brazilian Pantanal, *Journal of Essential Oil Research*, 12:1, 99-101, doi: 10.1080/10412905.2000.9712052
- Serafini, M. R., Vergne, D. M. C., Menezes, P. P., Santos, J. P. A., Rabelo, T. K., Saravanan, S., ... Quintans-júnior, L. J. (2017). Characterization and Evaluation of the Antioxidant Activity of Calamusenone, a Major Component of *Hyptis pectinata* (L.) Poit Essential Oil. *Letters in Drug Design E Discovery*, 14(April). <https://doi.org/10.2174/1570180814666170309130728>
- Shahidi, F., e Yeo, J. D. (2016). Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules*, 21(9). <https://doi.org/10.3390/molecules21091216>
- Shal, B., Ding, W., Ali, H., Kim, Y. S., e Khan, S. (2018). Anti-neuroinflammatory potential of natural products in attenuation of Alzheimer's disease. *Frontiers in Pharmacology*, 9(548), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00548>
- Sharma, N., e Tripathi, A. (2008). Integrated management of postharvest *Fusarium* rot of gladiolus corms using hot water , UV-C and *Hyptis suaveolens* (L.) Poit . essential oil, *Postharvest Biology and Technology* 47 (2008) 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.07.001>
- Sharma, P. P., Roy, R. K., Anurag, Gupta, D., e Vipin, K. S. (2013). *Hyptis suaveolens* (L.) poit: A phyto-pharmacological review. *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 4(1), 1–11.
- Sharma, V., e Ramawat, K. (2013). Isoflavonoids. In *Handbook of Natural Products* (pp. 293–326). https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_61
- Shen, X., Du, Q., Xu, Y., e Lu, Y. (2012). Stimulation of trans -resveratrol biosynthesis in *Vitis vinifera* cv . Kyoho cell suspension cultures by 2 , 3-dihydroxypropyl jasmonate elicitation, 15. <https://doi.org/10.2225/vol15-issue5-fulltext-4>

- Shenoy, C., Patil, M. B., e Kumar, R. (2009). Wound healing activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae). *International Journal of PharmTech Research*, 1(3), 737–744.
- Shi, M., Kwok, K. W., e Wu, J. Y. (2007). Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* Bunge (red or Chinese sage) hairy-root culture by hyperosmotic stress and yeast elicitor, 196, 191–196. <https://doi.org/10.1042/BA20060147>
- Shirwaikar, A., Shenoy, R., Udupa, A. L., Udupa, S. L., e Shetty, S. (2003). Wound healing property of ethanolic extract of leaves of *Hyptis suaveolens* with supportive role of antioxidant enzymes. *Indian Journal of Experimental Biology*, 41, 238–241.
- Siddiqui, Z. H., Mujib, A., Aslam, J., Hakeem, K. R., Parween, T., e Mahmooduzzafar. (2013). In vitro production of secondary metabolites using elicitor in *Catharanthus roseus*: a case study. In *Crop Improvement*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7028-1>
- Sidhu, Y. (2010). In vitro micropropagation of medicinal plants by tissue culture. *The Plymouth Student Scientist*, 4(41), 432–449.
- Sidibé, L., Chalchat, J., Garry, R., Harama, M. (2011). Aromatic Plants of Mali (III): Chemical Composition of Essential Oils of Two *Hyptis* Species: *H. suaveolens* (L.) Poit. and *H. spicigera* Lam., *Journal of Essential Oil Research*, 13:1, 55-57, DOI: 10.1080/10412905.2001.9699605
- Silva, A. B. L., Dias, K. S., Marques, M. S., Menezes, I. a. C., Santos, T. C., Mello, I. C. M., ... Antonioli, A. R. (2006). Avaliação do efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* Salmz. ex Benth. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(4), 475–479. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000400006>
- Silva, A. C. da, Souza, P. E. de, Machado, J. da C., Silva, B. M. da, e Pinto, J. E. B. P. (2012). Effectiveness of essential oils in the treatment of *Colletotrichum truncatum*-infected soybean seeds. *Tropical Plant Pathology*, 37(5), 305–313. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762012000500001>
- Silva, A. C., Souza, P. E., Amaral, D. C., Zeviani, W. M., e Pinto, J. E. B. P. (2014a). Óleos essenciais de *Hyptis marruboides*, *Aloysia gratissima* e *Cordia verbenacea* reduz o progresso da ferrugem asiática da soja. *Acta Scientiarum - Agronomy*, 36(2), 159–166. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v36i2.17441>
- Silva, A. F., Barbosa., L.C.A., Nascimento, F., Casali, V.W.D. (2000). Chemical Composition of the Essential Oil of *Hyptis glomerata* Mart. ex Schrank (Lamiaceae), <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9712201>
- Silva, A. M. de O., Andrade-Wartha, E. R. S., Carvalho, E. B. T., Lima, A., Novoa, A. V., e Mancini-Filho, J. (2011). Efeito do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o estresse oxidativo em ratos diabéticos. *Revista de Nutricao*, 24(1), 121–130. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732011000100012>

- Silva, C. G., Herdeiro, R. S., Mathias, C. J., Panek, A. D., Silveira, C. S., Rodrigues, V. P., ... Eleutherio, E. C. A. (2005). Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. *Pharmacological Research*, *52*(3), 229–233. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.03.008>
- Silva, C. G., Raulino, R. J., Cerqueira, D. M., Mannarino, S. C., Pereira, M. D., Panek, A. D., ... Eleutherio, E. C. A. (2009). *In vitro* and *in vivo* determination of antioxidant activity and mode of action of isoquercitrin and Hyptis fasciculata. *Phytomedicine*, *16*(8), 761–767. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.019>
- Silva, L. L., Garlet, Q. I., Benovit, S. C., Dolci, G., Mallmann, C. A., Bürger, M. E., ... Heinzmann, B. M. (2013a). Sedative and anesthetic activities of the essential oils of Hyptis mutabilis (Rich) Briq. and their isolated components in silver catfish (Rhamdia quelen). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *46*(9), 771–779. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20133013>
- Silva, R. F., Rezende, C. M., Santana, H. C. D., Vieira, R. F., e Bizzo, H. R. (2013b). Scents from Brazilian Cerrado: Chemical composition of the essential oil from the leaves of Hyptis villosa Pohl ex Benth (Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research*, *25*(5), 414–417. <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.828327>
- Silva, R. L., Melo, G. B. De, Antonioli, Â. R., Lima, S. O., Melo, V. A. De, Ramalho, F. S., Silva Junior, O. C. (2002). Efeito do extrato aquoso da Hyptis pectinata sobre a proliferação de hepatócitos após hepatectomia parcial. *Acta Cirurgica Brasileira*, *17*(3), 101–105. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502002000900021>
- Silva, R. M. G., Figueiredo, P. A. ., Peixoto, E. C. T. M. ., e Silva, L. P. (2014b). Antioxidant activity and determination of total phenol contents, carotenoids, beta-carotene, lycopene and zinc in white, yellow and pinkish varieties of Manihot esculenta crantz [Atividade antioxidante e determinação de fenóis totais, carotenoides, betaca. *Bioscience Journal*, *30*(2), 556–564. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0121-4>
- Silva, W. J., Dória, G. A. A., Maia, R. T., Nunes, R. S., Carvalho, G. A., Blank, A. F., ... Cavalcanti, S. C. H. (2008). Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresource Technology*, *99*(8), 3251–3255. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.064>
- Silva-Luz, C. L. D. A., Gomes, C. G., Pirani, J. R., Harley, R. M. (2012). Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Lamiaceae. *Bol. Bot. Univ. São Paulo*, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 109-155, 2012
- Silver, L. L. (2011). Challenges of antibacterial discovery. *Clinical Microbiology Reviews*, *24*(1), 71–109. <https://doi.org/10.1128/CMR.00030-10>
- Simões, R. R., Coelho, I. dos S., Junqueira, S. C., Pigatto, G. R., Salvador, M. J., Santos, A. R. S., e de Faria, F. M. (2017). Oral treatment with essential oil of Hyptis spicigera Lam. (Lamiaceae) reduces acute pain and inflammation in mice: Potential interactions with transient receptor potential (TRP) ion channels. *Journal of Ethnopharmacology*, *200*(February), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.02.025>

- Singh, D., Cho, W. C., e Upadhyay, G. (2016). Drug-induced liver toxicity and prevention by herbal antioxidants: an overview. *Frontiers in Physiology*, 6(363), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00363>
- Singh, H. B., e Handique, A. K. (1997). Antifungal Activity of the Essential Oil of *Hyptis suaveolens* and Its Efficacy in Biocontrol Measures, *Journal of Essential Oil Research*, 9:6, 683-687, DOI: 10.1080/10412905.1997.9700811.
- Singh, M., Kaur, M., e Silakari, O. (2014). Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 84, 206–239. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.013>
- Siqueira-Lima, P. S., Araújo, A. A. S., Lucchese, A. M., Quintans, J. S. S., Menezes, P. P., Alves, P. B., ... Quintans-Júnior, L. J. (2014). β -Cyclodextrin Complex Containing Lippia grata Leaf Essential Oil Reduces Orofacial Nociception in Mice - Evidence of Possible Involvement of Descending Inhibitory Pain Modulation Pathway. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 114(2), 188–196. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12145>
- Siramon, P., Ohtani, Y., e Ichiura, H. (2013). Chemical composition and antifungal property of Eucalyptus camaldulensis leaf oils from Thailand. *Records of Natural Products*, 7(1), 49–53. <https://doi.org/10.1007/s10086-007-0887-7>
- Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., e Sochor, J. (2015). Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 24673–24706. <https://doi.org/10.3390/ijms161024673>
- Skrzypczak-Pietraszek, E., Słota, J., e Pietraszek, J. (2014). The influence of L-phenylalanine, methyl jasmonate and sucrose concentration on the accumulation of phenolic acids in *Exacum affine* Balf. f. ex Regel shoot culture. *Acta Biochimica Polonica*, 61(1), 47–53. https://doi.org/10.18388/abp.2014_1922
- Soares, S. F., Borges, L. M. F., de Sousa Braga, R., Ferreira, L. L., Louly, C. C. B., Tresvenzol, L. M. F., ... Ferri, P. H. (2010). Repellent activity of plant-derived compounds against *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) nymphs. *Veterinary Parasitology*, 167(1), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.047>
- Souza, L. I. O., Bezzera-Silva, P. C., Navarro, D. M. A. F., Silva, A. G., Correia, M. T. S., Silva, M. V., e Figueiredo, R. C. B. Q. . (2017). The chemical composition and trypanocidal activity of volatile oils from Brazilian Caatinga plants. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, (November), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.121>
- Souza, L. K. H., De Oliveira, C. M. A., Ferri, P. H., De Oliveira, J. G., De Souza, A. H., Lisboa Fernandes, O. D. F., e Silva, M. D. R. R. (2003). Antimicrobial Activity of *Hyptis ovalifolia* Towards Dermatophytes. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(7), 963–965. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000700018>

- Spitzer, J. A., Zheng, M., Kolls, J. K., Stouwe, C. Vande, e Spitzer, J. J. (2002). Ethanol and LPS modulate NF-KAPPAB activation, inducible no synthase and COX-2 gene expression in rat liver cells in vivo. *Frontiers in Bioscience* 7, 352–358.
- Stratil, P., Klejdus, B., e Kubáň, V. (2006). Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables - Evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 607–616. <https://doi.org/10.1021/jf052334j>
- Sufian, A. S., Ramasamy, K., Ahmat, N., Zakaria, Z. A., e Yusof, M. I. M. (2013). Isolation and identification of antibacterial and cytotoxic compounds from the leaves of *Muntingia calabura* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 146(1), 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.12.032>
- Sumaryono, W., Proksch, P., Hartmann, T., Nimtz, M., e Wray, V. (1991). Induction of rosmarinic acid accumulation in cell suspension cultures of *Orthosiphon aristatus* after treatment with yeast extract. *Phytochemistry*, 30(10), 3267–3271. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83190-V](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83190-V)
- Sumitha, K. V., e Thoppil, J. E. (2016). Genotoxicity assessment of two common curing weeds: *Hyptis suaveolens* (L.) Poir. and *Leucas indica* (L.) R. Br. *Cytotechnology*, 68(4), 1513–1527. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9911-8>
- Sun, L., Guo, Y., Zhang, Y., e Zhuang, Y. (2017). Antioxidant and anti-tyrosinase activities of phenolic extracts from rape bee pollen and inhibitory melanogenesis by cAMP/MITF/TYR pathway in B16 mouse melanoma cells. *Frontiers in Pharmacology*, 8(104), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00104>
- Suzery, M., Cahyomo, B. e Astuti, P. The Acute Toxicity Test of Methanolic Extract of *Hyptis pectinata* Poit on Liver Balb/c Mice. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* 172 (2017) 012029 doi:10.1088/1757-899X/172/1/012029
- Sylvie, D. D., Anatole, P. C., Cabral, B. P., e Veronique, P. B. (2014). Comparison of in vitro antioxidant properties of extracts from three plants used for medical purpose in Cameroon: *Acalypha racemosa*, *Garcinia lucida* and *Hymenocardia lyrata*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4 (Suppl 2), S625–S632. https://doi.org/10.12980/APJTB.4.201414B1_68
- Sytar, O., Hemmerich, I., Zivcak, M., Rauh, C., e Brestic, M. (2018). Comparative analysis of bioactive phenolic compounds composition from 26 medicinal plants. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(4), 631–641. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.036>
- Szabo, E., Thelen, A., e Petersen, M. (1999). Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Reports*, 18(6), 485–489. <https://doi.org/10.1007/s002990050608>
- Tabata, K., Kim, M., Makino, M., Satoh, M., Satoh, Y., e Suzuki, T. (2012). Phenolic diterpenes derived from *hyptis incana* induce apoptosis and G 2/M arrest of neuroblastoma cells. *Anticancer Research*, 32(11), 4781–4790.
- Tafurt-García, G., Jiménez-Vidal, L. F., e Calvo-Salamanca, A. M. (2015). Antioxidant capacity and total phenol content of *Hyptis* spp ., *P. heptaphyllum*, *T. panamensis*, *T. rhoifolia* and *Ocotea* sp. *Rev. Colomb. Quim.*, 44(2), 28–33.

- Taghvaei, M., e Jafari, S. M. (2015). Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives. *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 1272–1282. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1080-1>
- Takayama, C., De-Faria, F. M., De Almeida, A. C. A., Valim-Araújo, D. D. A. E. O., Rehen, C. S., Dunder, R. J., ... Souza-Brito, A. R. M. (2011). Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil from *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 135(1), 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.03.002>
- Tanaka, N., Nishikawa, K., e Ishimaru, K. (2003). Antioxidative capacity of extracts and constituents in *Cornus capitata* adventitious roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(20), 5906–5910. <https://doi.org/10.1021/jf030267s>
- Tao, H., Zhou, J., Wu, T., e Cheng, Z. (2014). High-throughput superoxide anion radical scavenging capacity assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(38), 9266–9272. <https://doi.org/10.1021/jf502160d>
- Tchoumboungang, F., Zollo, P. H. A., Boyom, F. F., Nyegue, M. A., Bessièrè, J. M., e Menut, C. (2005). Aromatic plants of tropical Central Africa . XLVIII † . Comparative study of the essential oils of four *Hyptis* species from Cameroon : *H . lanceolata* Poit ., *H . pectinata* (L .) Poit ., *H . spicigera* Lam . and *H . suaveolens* Poit ., *Flavour Fragrance Journal*. 20: 340–343. <https://doi.org/10.1002/ffj.1441>
- Tesch, N. R., Yáñez, R. M., Rojas, X. M., Rojas-fermín, L., e Carrillo, J. V., Díaz, T., Vivas, F. M., Colmenares, C.Y., González, P. M. (2015). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae) de los Llanos venezolanos. *Revista peruana de biología* 22(1): 103 – 107. Doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v22i1.11127>
- Testai, L., e Calderone, V. (2017). Nutraceutical value of citrus flavanones and their implications in cardiovascular disease. *Nutrients*, 9(5), 1–13. <https://doi.org/10.3390/nu9050502>
- Thirugnanasampandan, R., e Jayakumar, R. (2011). Protection of cadmium chloride induced DNA damage by Lamiaceae plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(5), 391–394. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60086-5](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60086-5)
- Timmerman, R., Burm, S. M., e Bajramovic, J. J. (2018). An overview of in vitro methods to study microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12(242), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00242>
- Tonzibo, Z.F., Florence, A.B., Bédi, G., Chalchat, J.C. (2009). Chemical composition of essential oil of *Hyptis suaveolens* (L) Poit. From Côte d'Ivoire. *European Journal of Scientific Research*. ISSN 1450-216X, v.38, n.4, pp 565-571 .
- Tripathi, A. K., e Upadhyay, S. (2009). Repellent and insecticidal activities of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) leaf essential oil against four stored-grain coleopteran pests. *International Journal of Tropical Insect Science*, 29(4), 219–228. <https://doi.org/10.1017/S1742758409990282>

- Tripathi, A., Sharma, N., e Sharma, V. (2009). *In vitro* efficacy of *Hyptis suaveolens* L. (Poit.) essential oil on growth and morphogenesis of *Fusarium oxysporum* f.sp. gladioli (Massey) Snyder e Hansen. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(3), 503–512. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9916-y>
- Tripathi, P. K., Awasthi, S., Kanujiya, S., Tripathi, V., e Mishra, D. K. (2013). Callus culture and in vitro biosynthesis of cardiac glycosides from *Calotropis gigantea* (L.) Ait. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(4), 455-460.
- Tripathi, P., Tripathi, P., Kashyap, L., e Singh, V. (2007). The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 51(3), 443–452. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00329.x>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Tseng, Y. H., Yang, J.-H., Chang, H.-L., Lee, Y. L., e Mau, J. L. (2006). Antioxidant properties of methanolic extracts from monascal rice. *Food Chemistry*, 97, 375–381. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.06.002>
- Tucker, A. O. , Maciarelo, M. J. e Landrum, L. R. (2005) The Essential Oil of Desert-Lavender, *Hyptis emoryi* Torrey (Lamiaceae), from Arizona, *Journal of Essential Oil Research*, 17:2, 223-224, doi: 10.1080/10412905.2005.9698882
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(2), 335–344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., e Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, 7(1), 65–74. <https://doi.org/10.2174/157015909787602823>
- Vaccari, C., El Dib, R., e de Camargo, J. L. V. (2017). Paraquat and Parkinson's disease: A systematic review protocol according to the OHAT approach for hazard identification. *Systematic Reviews*, 6(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13643-017-0491-x>
- Varella, M. D. (1997). Biodiversidade : o Brasil e o quadro internacional. *Rev. Bras. Polit. Int.*, 40(1), 123–141. <https://doi.org/10.1590/S0034-73291997000100005>
- Vasconcelos, S. M. L., Goulart, M. O. F., Moura, J. B. D. F., Manfredini, V., Benfato, M. D. S., e Kubota, L. T. (2007). Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, 30(5), 1323–1338. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000500046>
- Vázquez, G., Fontenla, E., Santos, J., Freire, M. S., González-Álvarez, J., e Antorrena, G. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial Crops and Products*, 28(3), 279–285. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.03.003>

- Veberič, Robert. (2010). Bioactive compounds in fruit plants [online]. Acessado em 15 October 2018. ISBN 978-961-6275-35-4. Disponível em: http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2712/Bioactive_compounds_in_fruit_plants_-_Veberic.pdf
- Veiga Junior, V. F., Pinto, A. C., e Maciel, M. A. M. (2005). Plantas medicinais: Cura segura? *Química Nova*, 28(3), 519–528. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000300026>
- Velasco-Negueruela, A., Pérez-Alonso, M.J., Esteban, J.L., Guzmán, C.A., Zygadlo, J.A., Espinar, L.A. (1995). Volatile constituents of *Hyptis mutabilis* (Rich) Briq. *Journal Essential Oil Research*, 7, 81-82.
- Velóz, R. A., Taketa, A. C., e Villarreal, M. L. (2013). Production of podophyllotoxin from roots and plantlets of *Hyptis suaveolens* cultivated in vitro. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.110538>
- Vera-Arzave, C., Antonio, L. C., Arrieta, J., Cruz-Hernández, G., Velázquez-Méndez, A. M., Reyes-Ramírez, A., e Sánchez-Mendoza, M. E. (2012). Gastroprotection of suaveolol isolated from *Hyptis suaveolens*, against ethanol-induced gastric lesions in wistar rats: Role of prostaglandins, nitric oxide and sulfhydryls. *Molecules*, 17(8), 8917–8927. <https://doi.org/10.3390/molecules17088917>
- Verma, N., e Shukla, S. (2015). Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.09.002>
- Vieira, C. B. S., e Orlando, J. F. F. (2018). Atividade antioxidante e fotoprotetora do extrato etanólico de *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca, Lamiaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 23.
- Vijayarathna, S., e Sasidharan, S. (2012). Cytotoxicity of methanol extracts of *Elaeis guineensis* on MCF-7 and Vero cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(10), 826–829. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60237-8](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60237-8)
- Violante, I. M. P., Hamerski, L., Garcez, W. S., Batista, A. L., Chang, M. R., Pott, V. J., e Garcez, F. R. (2012). Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1302–1308.
- Vongsombath, C., Pålsson, K., Björk, L., Borg-Karlson, A.-K., e Jaenson, T. G. T. (2012). Mosquito (Diptera: Culicidae) Repellency Field Tests of Essential Oils From Plants Traditionally Used in Laos. *Journal of Medical Entomology*, 49(6), 1398–1404. <https://doi.org/10.1603/ME12025>
- Wang, J. W., e Wu, J. Y. (2013). Effective Elicitors and Process Strategies for Enhancement of Secondary Metabolite Production in Hairy Root Cultures. In *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/10>
- Ward, F. M., Daly, M. J. (1999). Hepatic disease, in: R. Walker, C. Edwards (Eds.). *Clinical pharmacy and therapeutics churchill livingstone*, 195-212.

- Wasim, A., Garima, V., Faraz, K. M., Mohammad, S., Mymoona, A., Ozair, A., e Mohammad, A. (2017). International Journal of Drug Development Flavone ' s Worth in the Development of Anticancer Agents, 9(Scheme 2), 26–32.
- White, Y., Hamada, T., Yoshimitsu, M., Nakashima, M., Hachiman, M., Kozako, T., ... Arima, N. (2011). Novel cytotoxic isolated from Jamaican Hyptis verticillata jacq induces apoptosis and overcomes multidrug resistance. *Anticancer Research*, 31(12), 4251–4257. <https://doi.org/31/12/4251> [pii]
- WHO/EMP/IAU/2017.12. (2017). *Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis*. <https://doi.org/10.1002/9781118325421>
- Wibberley, M. S., John, R., e Steven, J. (1994). Sesquiterpenoid phytoalexins produced by hairy roots of Nicotiana Tabacum. *Phytochemistry*, 37(2), 349–351.
- Wu, J. G., Kan, Y. J., Wu, Y. Bin, Yi, J., Chen, T. Q., e Wu, J. Z. (2016). Hepatoprotective effect of ganoderma triterpenoids against oxidative damage induced by tert-butyl hydroperoxide in human hepatic HepG2 cells. *Pharmaceutical Biology*, 54(5), 919–929. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1091481>
- Xie, W., Sun, J., Zhang, X., e Melzig, M. F. (2014). Necrosis factor-alpha (TNF- α) response in human hepatoma HepG2 cells treated with hepatotoxic agents. *Pharmazie*, 69(5), 379–384. <https://doi.org/10.1691/ph.2014.3805>
- Xu, D. H., Huang, Y. S., Jiang, D. Q., e Yuan, K. (2013). The essential oils chemical compositions and antimicrobial, antioxidant activities and toxicity of three Hyptis species. *Pharmaceutical Biology*, 51(9), 1125–1130. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.781195>
- Yan, Q., Hu, Z., Xiang, R., e Wu, J. (2005). Efficient production and recovery of diterpenoid tanshinones in Salvia miltiorrhiza hairy root cultures with in situ adsorption , elicitation and semi-continuous operation, 119, 416–424. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.04.020>
- Yang, C., Zhang, C., Wang, Z., Tang, Z., Kuang, H., e Kong, A. N. T. (2016). Corynoline Isolated from Corydalis bungeana Turcz. Exhibits Anti-Inflammatory Effects via Modulation of Nfr2 and MAPKs. *Molecules*, 21, 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules21080975>
- Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomás-Barberán, F. A., Datta, N., Singanusong, R., e Chen, S. S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Journal of Attention Disorders*, 59, 113–122. <https://doi.org/10.1177/1087054716676342>
- Yoon, J., Ham, H., Sung, J., Kim, Y., Choi, Y., Lee, J. S., ... Kim, D. (2014). Black rice extract protected HepG2 cells from oxidative stress-induced cell death via ERK1/2 and Akt activation. *Nutrition Research and Practice*, 8(2), 125–131. <https://doi.org/10.4162/nrp.2014.8.2.125>
- Yu, Y., Shen, Q., Lai, Y., Park, S. Y., Ou, X., Lin, D., ... Zhang, W. (2018). Anti-inflammatory effects of Curcumin in microglial cells. *Frontiers in Pharmacology*, 9(386), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00386>

- Yuste, J. E., Tarragon, E., Campuzano, C. M., e Ros-Bernal, F. (2015). Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(AUGUST), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00322>
- Zani, C.L.; Chaves, P.P.G.; Queiroz, R.; Mendes, N.M.; Oliveira, A.B.; Cardoso, J.E.; Anjos, A.M.G.; Grandi, T.S. (1995). Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *Phytomedicine*, 2: 47-50.
- Zapata, B., Durán, C., Stashenko, E., Betancur-Galvis, L., e Mesa-Arango, A. C. (2009). Antifungal activity, cytotoxicity and composition of essential oils from Labiatae family plants. *Rev Salud UIS*, 41, 223–230. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182017000300251>
- Zellner, B. D.; Amorim, A. C. L.; Miranda, A. L. P. de; Alves, R. J. V. ; Barbosa, J. P.; Costa, G. L. da; Rezende, C. M. (2009). Screening of the OdourActivity and Bioactivity of the Essential Oils of Leaves and Flowers of *Hyptis passerina* Mart. from the Brazilian Cerrado. *Journal of the Brazilian Chemistry Society*. v. 20, n. 2, p. 322-332.
- Zhao, J., Davis, L. C., e Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites, 23, 283–333. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.003>
- Zhao, J., Fujita, K., Yamada, J., e Sakai, K. (2001). Improved β -thujaplicin production in *Cupressus lusitanica* suspension cultures by fungal elicitor and methyl jasmonate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (55), 301–305. <https://doi.org/10.1007/s002530000555>
- Zinner, S. H. (2005). The search for new antimicrobials: Why we need new options. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 3(6), 907–913. <https://doi.org/10.1586/14787210.3.6.907>
- Złotek, U., Szymanowska, U., Pecio, U., Kozachok, S., e Jakubczyk, A. (2019). Antioxidative and Potentially Anti-inflammatory Activity of Phenolics from Lovage Leaves *Levisticum officinale* Koch Elicited with Jasmonic Acid and Yeast Extract. *Molecules*, 24(7). <https://doi.org/10.3390/molecules24071441>
- Zoghbi, M.G.B., Andrade, E.H.A., Silva, M.H.L., Maria, J.G.S.M., Luz, A.I.R., Silva, J.D. (2002). Chemical variation in the essential oils of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. *Flavour and Fragrance Journal*, 17:5–8. <https://doi.org/10.1002/ffj.103>