

Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos metanólico e hexânico do caule folhado de *Melissa Officinalis*

Evaluation of the Antibacterial Activity of Methanolic and Hexanic Extracts of Puff Pastry Stem, *Melissa Officinalis*

Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos metanol y hexano, el tallo rodadura *Melissa Officinalis*

Amanda T. L. de Sousa MD¹, Raul de S. Andreza MD¹, Erivania F. Alves MD¹, Ana J. F. Cruz MD¹, Livia M. G. Leandro MD¹, Tássia T. de A. M. Guedes MD¹, Rakel O. de Macêdo MD¹, Luciene F. de Lima MD², Cícera Datiane M. de Oliveira-Tintino MD², Henrique D. M. Coutinho PhD², Saulo R. Tintino PhD³, Priscila C. V. de Sousa MSc⁴, Pedro E. A. de Aquino MSc⁴

Recibido: 12 de marzo de 2015 • Aceptado: 13 de septiembre de 2015

Doi: [dx.doi.org/10.12804/revsalud14.02.2016.05](https://doi.org/10.12804/revsalud14.02.2016.05)

Para citar este artículo: Sousa LAT de, Andreza de SR, Alves EF, Cruz FAJ, Leandro GLM, Guedes de AMTT, et al. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos metanólico e hexânico do caule folhado de *Melissa Officinalis*. Rev Cienc Salud. 2016;14(2):201-10. doi: [dx.doi.org/10.12804/revsalud14.02.2016.05](https://doi.org/10.12804/revsalud14.02.2016.05)

Resumo

Introdução: *Melissa officinalis*, da família Lamiaceae, é uma erva comumente utilizada na medicina popular. É conhecida no Brasil como Melissa, erva cidreira, cidrilha e melitéia. Tendo em vista que *M.officinalis* L é largamente utilizada na medicina popular, dentre elas para uso antibacteriano, este trabalho teve como principal objetivo avaliar a atividade antibacteriana e modulatória de extratos metanólico e hexânico do caule folhado de *M. officinalis* frente a cepas de bactérias padrões e multirresistentes. **Materiais e métodos:** Os extratos metanólico e hexânico do caule folhado de *M. officinalis* L foram analisados para a atividade antibacteriana por meio de teste de microdiluição para determinação de concentração inibitória mínima (CIM) e modulação de aminoglicosídeos (gentamicina e amicacina). **Resultados:** Na avaliação da CIM foram obtidos resultados $\geq 1024 \mu\text{g}/\text{mL}$ contra as bactérias (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) em ambos extratos. O extrato metanólico mostrou resultados relevantes em associação com gentamicina potencializando o efeito contra *E. coli* e *S. aureus* quando associado à amicacina, nesta bactéria houve antagonismo. Já o extrato hexânico, resultou em uma redução da CIM de amicacina e gentamicina frente a linhagens de *E. coli*, mostrando efeito antagonista com a amicacina contra cepas

1 Faculdade Leão Sampaio, Curso de Graduação em Biomedicina.

2 Universidade Regional do Cariri-URCA, Departamento de Química Biológica.

3 Universidade Regional do Cariri-URCA, Departamento de Química Biológica, Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular. Depart. de Química Biológica Depart. de Ciências Biológicas. Correspondência: saulorelison@gmail.com

4 Universidade Federal do Ceará, Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

de *S. aureus*. **Conclusão:** Conclui-se que o material vegetal influencia no comportamento dos antimicrobianos, tornando este trabalho importante como parâmetro para estudos mais aprofundados que possam combater a crescente resistência de bactérias patogênicas.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana, *Melissa officinalis* *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

Abstract

Introduction: *Melissa officinalis*, of the Lamiaceae family, is a herb commonly used on folk medicine. In Brazil it is known as Melissa, erva cidreira, cidrilha and meliteia. Considering that the *M. Officinalis* L is widely used in folk medicine, as for antibacterial use, among others, the main objective of this work was to evaluate the antibacterial and modulating activity of methanolic and hexanic extracts of *M. officinalis* L against pattern and multidrug resistant bacterial strains. **Material and methods:** The methanolic and hexanic extracts of the stem of puff pastry of *M. officinalis* L were analyzed to determine antibacterial activity by using the microdilution for establishing the minimal inhibitory concentration (MIC) and aminoglycosides (gentamicin and amikacin) modulation. **Results:** In the MIC evaluation, the results obtained were ≥ 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against bacteria (*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) in both extracts. The methanolic extract showed important results when associated with gentamicin, since it potentiates its effect against *E. coli* and *S. aureus* when associated with amikacin, where antagonism was found. As to the hexanic extract, it showed a MIC reduction of amikacin and gentamicin against *S. aureus* strains. **Conclusion:** It was concluded that the plant material influences the antimicrobial behavior, a fact that makes this study an important parameter to deeper studies to combat the increase of pathogenic multidrug-resistant bacteria.

Keywords: Antimicrobial activity, *Melissa Officinalis*, *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*.

Resumen

Introducción: *Melissa Officinalis*, de la familia Lamiaceae, es una hierba utilizada en la medicina popular. Es conocido en Brasil como *erva cidreira*, *melisa*, y *melitéia cidrilha*. Teniendo en cuenta que *M. Officinalis* L. se utiliza ampliamente en la medicina popular, entre ellos para uso antibacteriano, este trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad antibacteriana y modulador de extracto de metanol y hexano rodar el tallo de *M. officinalis* L. frente a las cepas de bacterias normas y las bacterias multirresistentes. **Materiales y métodos:** se analizó el extracto de metanol y hexano del tallo rodadura *M. Officinalis* L. para la actividad antibacteriana por una prueba de microdilución para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y la modulación de aminoglucósidos (gentamicina y amikacina). **Resultados:** en la evaluación de la MIC los resultados obtenidos fueron ≥ 1024 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con contra las bacterias (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*) en ambos extractos. El extracto de metanol mostró resultados significativos en combinación con efecto potenciador gentamicina contra *E. coli* y *s. Aureus* cuando se combina con amikacina, esta bacteria era antagonismo. Ya extracto de hexano dio lugar a una reducción de la MIC de amikacina y gentamicina contra cepas de *E. coli*, que muestra el efecto antagónico con cepas de la cuenta de amikacina de *S. Aureus*. **Conclusión:** se concluye que el material vegetal

influye en el comportamiento de los antimicrobianos, lo que hace este trabajo importante como parámetro para futuros estudios que puedan combatir la creciente resistencia de las bacterias.

Palabras clave: actividad antimicrobiana, *Melissa Officinalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

Introdução

O uso de plantas medicinais para fins terapêuticos segue ainda como prática comum pela humanidade, desde os tempos mais remotos. Sua utilização é influenciada, principalmente, pelo fácil acesso e pela tradição familiar e cultural desse tipo de tratamento (1), associados com efeitos negativos causados pelo uso abusivo de medicamentos sintéticos (2).

O efeito farmacológico que essas plantas têm deve-se à presença de princípios ativos em seus componentes, que quando devidamente estudados, podem ser caracterizados e assim serem melhor utilizados como forma terapêutica (3, 4).

Melissa officinalis, chamada de erva-cidreira, pertencente à família Lamiaceae é, arbustiva, podendo atingir de 30 a 100 cm de altura, caule quadrangular, herbáceo, ereto, piloso. As folhas são verde-escura, ovais, pilosas e com nervuras bem salientes. As flores podem ser brancas ou amarelas em fascículos de 2 a 6 unidades com florescimento geralmente de outubro a março (5).

Dentre as propriedades terapêuticas de *Melissa officinalis* destacam-se principalmente sua utilidade no tratamento de distúrbios do sono e controle das emoções (6). Outras propriedades que foram citadas incluem efeito antisséptico revitalizante, antidepressivo, antialérgico, rejuvenescedor, carminativo, hipotensor, sudorífero, tônico geral, antiespasmódico, bálsamo cardíaco, antidiarrético e antiemético. Usada também como regulador menstrual, ajuda no combate a cólicas, e possui efeito positivo em problemas gastrointestinais. Existem estudos

da ação do óleo essencial de *M. officinalis* como antitumoral (7).

As bactérias estão intimamente inseridas no cotidiano do homem (8). *Escherichia coli*, por exemplo, é uma bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae (9). São bactérias que habitam principalmente o trato intestinal do homem e de outros animais de sangue quente. Porém alguns sorotipos, que não pertencem à flora normal do homem, podem ser responsáveis por algumas infecções. *E. coli* é considerada o maior agente causador de infecções urinárias em humano (10).

A bactéria *Staphylococcus aureus* é outra bactéria que faz parte da flora normal dos humanos podendo ser encontrada na pele e nas fossas nasais de indivíduos saudáveis, entretanto podem também estar relacionadas a infecções simples a mais graves (11).

Bactérias mutantes que resultam do uso desordenado e prolongado de antibacterianos possuem resistência à composição desses medicamentos utilizados intensivamente (12). As bactérias resistentes passam a não ser mais inibidas pela concentração comumente utilizada do antimicrobiano (13). Por essa razão há uma importância em aperfeiçoar e desenvolver novos medicamentos, o que torna os antimicrobianos naturais uma alternativa para esse problema (14).

Tendo em vista que *Melissa Officinalis*, é largamente utilizada na medicina popular, houve um interesse de pesquisar qualitativamente os compostos presentes nesta planta e verificar a atividade antibacteriana dos extratos metanólico e hexânico frente a cepas de bactérias padrões e multirresistentes determinando a

Concentração Inibitória Mínima (CIM), como também a eficácia destes modulando-os com os aminoglicosídeo samicacina e gentamicina.

Materiais e métodos

Material vegetal

O material vegetal de *Melissa officinalis*. foi coletado no município de Juazeiro do Norte, Ceará, Brasil, no mês de setembro de 2014. A espécie foi enviada para o Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima (HCDAL) do Departamento de Ciências Biológicas (URCA) com número de exiscata 10789.

Material bacteriano

Os microrganismos utilizados nos testes foram obtidos através do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA). Foram utilizadas linhagens padrão de bactérias *Escherichia coli* ATCC 10536; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e multirresistentes da espécie *Escherichia coli* 27 e *Staphylococcus aureus* 358. Antes dos ensaios, as linhagens foram cultivadas a 35 °C por 24 horas em *Brain Heart Infusionbroth*-BHI (DifcoLaboratoriesLtda) (tabela 1).

Preparação dos extratos metanólico e hexânico

Para preparação dos extratos o caule folhado fresco (100g) permaneceu submerso em metanol e hexano separadamente por 72h. Após esse período, o efluente foi filtrado em papel filtro para separação dos resíduos sólidos e concentrado em condensador rotativo a vácuo e banho-maria (model Q-214M2 – Quimis, Brazil) (13), obtendo-se rendimentos dos extratos brutos dos extratos brutos de 15 % para o metanol e 9 % para o hexano. Para os testes foram utilizadas soluções preparadas a partir dos extratos sob uma concentração de 10 mg/mL, dissolvidos em DMSO (dimetil sulfóxido), em seguida diluídos com água destilada para uma concentração de 1024 µg/mL.

Prospecção fitoquímica

Os testes fitoquímicos foram utilizados para detectar a presença de metabólitos secundários, proposto por Matos (15). Esses testes são baseados na mudança de coloração e pH após adição de reagentes específicos.

Teste de atividade antibacteriana

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada em ensaio de microdiluição em caldo utili-

Tabela 1. Origem bacteriana e perfil de resistência a antibióticos

| Bactéria | Origem | Resistência a antibióticos |
|---------------------------------------|-----------------|---|
| <i>Staphylococcus aureus</i> (SA 358) | Feridacirúrgica | Oxa, Gen, Tob, Ami, Ca, Neo, Para, But, Sis, Net |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 25923 | Sensível |
| <i>Escherichia coli</i> (EC 27) | Feridacirúrgica | Ast, Ax, Amp, Ami, Amox, Ca, Cfc, Cf, Caz, Cip, Clo, Im, Can, Szt, Tet, Tob |
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC 10536 | Sensível |

Legenda: Ast-Azitromicina; Ax- Amoxicilina; Amp-Ampicilina; Ami-Amicacina; Amox-Amoxicilina, Ca-Cefalexina; Cfc- cefaclor; Cf- Cefalotina; Caz-Ceftazimidina; Cip-Ciprofloxacino; Clo –Clorafenicol; Im-Imipenem; Can-Canamicina; Szt-Sulfametoxazol, Tet-Tetraciclina; Tob- Tobramicina; Oxa- Oxacilina; Gen-Gentamicina; Neo- Neomicina; Para- Paramomicina; But- Butirosina; Sis-Sisomicina; Net- Netilmicina.

zando-se um inóculo de 100 µL de cada linhagem, suspensas em caldo BHI que apresentava uma concentração de 10^5 UFC/mL em placas de microdiluição com 96 poços, com diluições em série $\frac{1}{2}$ (16). Em cada poço foi adicionado 100 µL de solução de cada extrato. As concentrações finais dos extratos variaram entre 512 – 8 µg/mL. Para os controles foram utilizados os antibióticos padrões ampicilina, e gentamicina cujas concentrações finais variaram entre 512 µg/mL – 8,0 µg/mL. As CIMs foram registradas como as menores concentrações para a inibição do crescimento. Para evidenciá-las, preparou-se uma solução indicadora de resazurina sódica (Sigma) em água destilada estéril na concentração de 0,01 % (p/v). Após a incubação, 20 µL da solução indicadora serão adicionados em cada cavidade e as placas passarão por um período de incubação de 1 hora em temperatura ambiente. A mudança de coloração azul para rosa, devido à redução da resazurina, indica o crescimento bacteriano, auxiliando a visualização da CIM, definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano, evidenciado pela cor azul inalterada (17).

Modulação e leitura dos ensaios

Os extratos foram misturados em caldo BHI 10 % em concentrações sub-inibitórias, obtidos e determinados após a realização de teste de avaliação da CIM, sendo que para o teste de modulação a concentração da solução de extrato

foi reduzida 8 (oito) vezes (CIM/8). A preparação das soluções de antibióticos foi realizada com a adição de água destilada estéril em concentração dobrada (1024 µg/mL) em relação à concentração inicial definida e volumes de 100 µL diluídos seriadamente 1:1 em caldo BHI 10 %. Em cada cavidade com 100 µL do meio de cultura continha a suspensão bacteriana diluída (1:10). Os mesmos controles utilizados na avaliação da CIM para os extratos foram utilizados durante a modulação (18). As placas preenchidas foram incubadas a 35 °C por 24 horas e após esse período a leitura foi evidenciada pelo uso de resazurina como citado anteriormente no teste de determinação da CIM.

Análise Estatística dos resultados

Os ensaios foram feitos em triplicata, e expressos como média geométrica. Na análise estatística foi aplicada à análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni utilizando o software *GraphPadPrism* 6.0.

Resultados e discussão

Os extratos metanólico e hexânico de *M. officinalis* L foram submetidos a uma avaliação fitoquímica para a detecção ou não dos metabólitos secundários (tabela 2).

Após a realização do teste de CIM com bactérias (*E. coli* e *S. aureus*) foram obtidos resultados

Tabela 2. Metabólitos encontrados na prospecção fitoquímica de *Melissa officinalis*

| Metabólitos | EHMO | EMMO |
|--|--------|--------|
| Taninos | - | + |
| Flavonas/ Flavonois/ Chantonas/ Chalconas e Auronas/ Flavanonois | ++++++ | ++++++ |
| Catequinas | + | + |
| Leucoantocianidas/Flavononas | ++ | -- |
| Alcaloides | - | - |

EHMO- Extrato Hexânico de *Melissa officinalis* EMMO- Extrato metanólico de *Melissa officinalis*

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) (µg/mL) dos extratos metanólico e hexânico de *Melissa officinalis*

| Bacteria | EHMO | EMMO |
|--------------------------|-------------|-------------|
| <i>E.coli</i> -10536 | ≥1024µg/mL | ≥1024µg/mL |
| <i>E.coli</i> -27 | ≥ 1024µg/mL | ≥1024 µg/mL |
| <i>S. aureus</i> - 25922 | ≥1024 µg/mL | ≥1024 µg/mL |
| <i>S.aureus</i> -358 | ≥1024 µg/mL | ≥1024 µg/ML |

EHMO- Extrato Hexânico de *Melissa officinalis* EMMO- Extrato metanólico de *Melissa officinalis*

≥1024 µg/ML para o extrato metanólico e para o extrato hexânico de *M. officinalis* L (tabela 3).

No teste de modulação o extrato hexânico, quando combinado com amicacina, não apresentou resultados relevantes diante de cepas de *S. aureus*. Quando combinado com gentamicina

mostrou antagonismo frente estas cepas. Já com relação às cepas de *E. coli* o extrato hexânico possuiu efeito sinérgico (p<0,001) em combinação com ambos antibióticos (tabela 4 e figura1).

O extrato metanólico mostrou efeito sinérgico (p<0,001) em associação com gentamicina tanto

Tabela 4. Concentração inibitória mínima (µg/mL) de aminoglicosídeos na ausência e presença dos extratos metanólico e hexânico de *Melissa officinalis*

| <i>S.aureus</i> -358 | EHMO | EMMO | Controle |
|----------------------|-------------|-------------|------------|
| Amicacina | 625 µg/mL | 1250 µg/mL | 625µg/mL |
| Gentamicina | 625 µg/mL | 19,53 µg/mL | 78,12µg/mL |
| <i>E. coli</i> -27 | EHMO | EMMO | Controle |
| Amicacina | 156,25µg/mL | 312,5µg/mL | 312,5µg/mL |
| Gentamicina | 312,5µg/mL | 39,06µg/mL | 625 µg/mL |

EHMO- Extrato Hexânico de *Melissa officinalis* EMMO- Extrato metanólico de *Melissa officinalis*

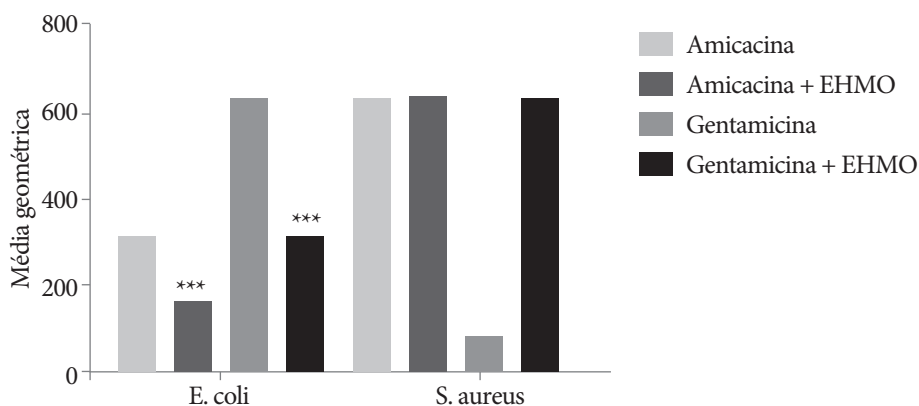


Figura 1: Concentração inibitória mínima (µg/mL) de aminoglicosídeos na ausência e presença do EHMO, *Escherichia coli* 27, *Staphylococcus aureus* 03. EHMO - Extrato Hexânico de *Melissa officinalis* *** valor estatístico significante p<0,001

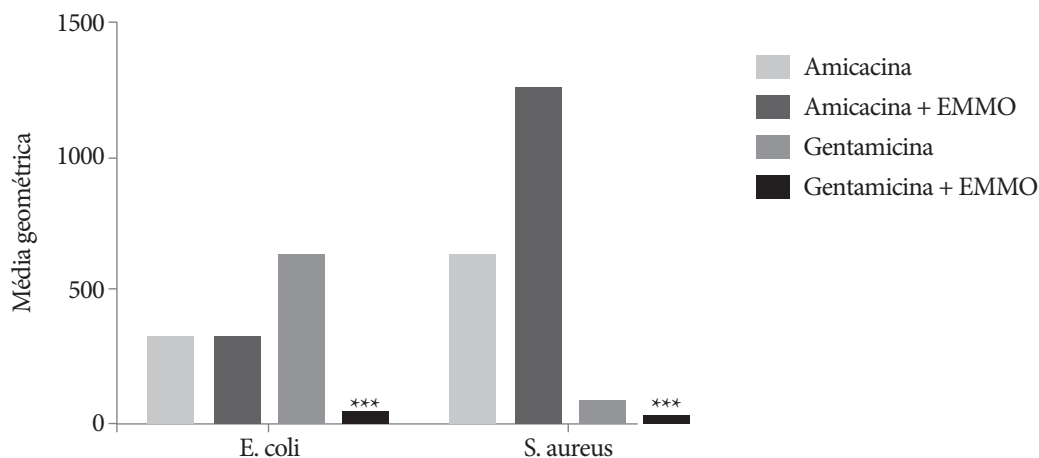


Figura 2: Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) de aminoglicosídeos na ausência e presença do EMMO, *Escherichia coli* 27, *Staphylococcus aureus* 03. EMMO - Extrato Metanólico de *Melissa officinalis* *** valor estatístico significante $p < 0,001$

frente cepas de *S. aureus* quanto cepas de *E. coli*. O extrato metanólico mostrou ainda, que quando adicionado a amicacina possuiu, perante cepas de *S. aureus* e *E. coli*, efeito antagônico e efeito não relevante, respectivamente. Estes resultados encontram-se descritos na tabela 4 e na figura 2.

Segundo Simões e Lorenzi e Matos (5), os metabólitos taninos e flavonoides já foram determinados nas folhas de *M. officinalis*L, sendo estes comprovados no presente estudo (19). Estes metabólitos bem como os alcaloides, são descritos como modificadores da atividade antibiótica (20).

Os taninos são derivados dos ácidos rosmarínico e cafeicoe são alguns dos mais importantes compostos isolados a partir do extrato de *M. officinalis*L (21). Este metabólito possui atividade antiviral e antioxidante comprovadas em outros estudos (22). O mecanismo de ação antimicrobiano deste metabólito pode ser explicado pela capacidade de inibição de enzimas bacterianas e fúngicas e pela sua ação direta nas membranas destes micro-organismos bem como a modificação de seu metabolismo (23).

Com a prospecção fitoquímica foram identificadas as presenças dos metabólitos flavonoides,

os quais possuem como classes principais: flavonas, flavonóis, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, antocianidinas e leucoantocianidinas (24).

Os flavonoides e seus derivados são compostos moleculares presente em hortaliças e biosintetizados a partir de precursores de grupos de substâncias como aminoácidos alifáticos, terpenóides e ácidos graxos (25). Estes participam do desenvolvimento e do sistema de defesa dos vegetais contra o ataque de microrganismos (26). Possuem atividade antibacteriana e antioxidante (27) onde, a capacidade de formar complexos com proteínas extracelulares que se ligam a parede celular de bactérias, determina o seu mecanismo de ação antibacteriano (28).

O sinergismo ocorre quanto o efeito de um antibacteriano aumenta em uma ação conjunta com outra substância. O mecanismo que regula a ação conjunta pode ser caracterizado pelo aumento da permeabilidade na membrana das bactérias, facilitando o influxo destes antibacterianos, inibidores da bomba de efluxo, entre outros (29).

No teste de modulação pôde-se observar efeito sinérgico tanto para o extrato hexânico, como para o metanólico. Esse sinergismo obtido

por extratos de *M. officinalis* L com antibióticos, comumente utilizados frente bactérias gram-positivas (*S. aureus*) e gram-negativas (*E. coli*), foi apresentado também no estudo com metodologia semelhante ao trabalho, onde foi avaliada a interação sinérgica entre antibióticos e extratos da mesma planta. Estes resultados entram em conformidade e comprovam tal efeito (30).

De acordo com a pesquisa, a característica de ação antagonista, apresentada pelos dois extratos (metanólico e hexânico) de *M. officinalis* L. frente cepas de *S. aureus*, deve-se a capacidade de quelação do antibiótico ou dos metabólitos presentes no extrato, quando combinados, fazendo com que haja um aumento da CIM destes (31). Os metabólitos presentes na planta por vezes podem inibir ou aumentar o efeito dos antibióticos.

Conclusão

O presente estudo demonstrou que os extratos-metanólico e hexânico de *M. officinalis* L isolados não obtiveram atividade antibacteriana relevante frente às cepas de *E. coli* e *S. aureus*.

No entanto, houve uma modulação nos antibióticos testados quando combinados com ambos os extratos. Esta ação provavelmente deve-se aos metabólitos presentes nestes, causando tanto efeitos sinérgicos como antagonísticos. Assim verificou-se que o material vegetal influencia no comportamento dos antibacterianos tornando *M. officinalis* L promissora no combate a crescente resistência de bactérias patogênicas, já que houve efeitos sinérgicos; isto faz deste trabalho importante como parâmetro para estudos mais aprofundados em relação aos metabólitos presentes nesta planta, bem como seus efeitos mais detalhados se tratando de sinergismo e antagonismo.

Agradecimentos

Os autores agradecem as Instituições de Ensino Superior Universidade Regional do Cariri através do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) e a Faculdade Leão Sampaio pelo apoio estrutural e as agências financiadoras de pesquisa FUNCAP, CNPQ e CAPES.

Referências

1. Veiga-Junior VF, Pinto AC, Maciel MA. Plantas medicinais: cura segura? Quim Nov, 2005;28(3):519-28.
2. Rates SMK. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. Rev Bras Farmacogn 2001;11(12):57-67.
3. Santos JAS, Sena TJO, Da Silva KB, Pinheiro CTS, Dos Santos CT, Sousa LIO, et al. Potencialbioativo da *Melissa officinalis* 64.^a Reunião Anual da SBPC. 2012.
4. Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2.^a ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2002.
5. Blank AF, Fontes SM, Oliveira AS, Mendonça MC, Silva-Mann R, Arrigoni-Blank MF. Produção de mudas, altura e intervalo de corte em *Melissa*. Hortiç Brasileira, Brasília, 2005;23(3):780-4.
6. Sadraei H, Ghannadi A, Malekshahi K. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. Fitoterapia, 2003;(74):445-52.
7. Silva TX, Jesus AM, Carvalho VF, Moraes SR, Votre SJ, Avelar KES. Propriedades terapêuticas de plantas medicinais cultivadas no projeto sementinha, Rev Ausg. 2008:1-11.
8. Gomes BQ, Ambrózio BC, Da Silva GRQ, Santana DA, Assunção T, Colovato MR, et al. Resistência da Bactéria *E. coli*. Apresentado em: IX Simposio de Base Experimental das Ciências Naturais. 2011.

9. Brasil. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N.º 12, Aprova o Regulamento sobre padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I e II (2 ene. 2001). Diá ofi da República Federativa do Brasil, 2001;1(7).
10. Pelczar JRMJ, Chan ECS, Krieg NR. Microbiologia: Conceito e aplicações. São Paulo-SP: McGraw-Hill; 1997.
11. Santos AL, Santos DO, Freitas CC, Ferreira BL, Afonso LF, Rodrigues CR, Castro HC. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. J. Bras. Patol. Med. Lab, 2007;43(6):413-23.
12. Vargas AC, Loguercio AP, Witt NM, Costa MM, Silva MS, Viana LR. Atividade Antimicrobiana “in vitro” de Extrato Alcoólico de Própolis. Ciên Ru San Mar, 2004;34(1):159-63.
13. Rodriguez JAG, Cantón R, Sánchez JEG, Gómez-LusML, Martínez L, Rodríguez-Avial C, et al. Procedimientos em microbiología clínica. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos 2000.
14. Brasileiro BG, Pizziolo VR, Raslan DS, Jamal CM, Silveira D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. Rev. Bras. Cienc. Farm, 2006;42(2).
15. Matos FJA. Fortaleza-Ceará, Brasil: UFC Edições. 1997.
16. NCCLS. Nattinal Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically. 6.ª ed. Pennsylvania; 2003.
17. Javadpour MM, Juban MM, Lo WC, Bishop SM, Alberty JB, Cowell SM, et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. J Med Chem, 1996;39(16):1902-07.
18. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira JR JP. Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin -resistant *Staphylococcus aureus* by *Turneraulmifolia* L. BMC complementary and alternative medicine, 2009;9(13):1-4.
19. Simões CMO, Mentz LA, Schenkel EP, Irgang BE, Stehmann JR. Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul. 50.ª ed. Porto Alegre, RS: UFRGS;1998.
20. Matias EEF, Santos KKA, Almeida TS, Costa JGM, Coutinho HDM. Enhancement of Antibiotic Activity by *Cordia verbenacea* DC. Latin Am. J. Pharm, 2010;29(6):1049-52.
21. Bolkent S, Yanardag R, Karabulut-Bulan O, Yesilyaprak B. Protective role of *Melissa officinalis* extract on the liver of hyperlipidemic rats: a morphological and biochemical study. J Ethnopharmacol, 2005;99:391-98.
22. Carnat AP, Carnat A, Fraisse D, Lamaison JL. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* subsp. *officinalis*) tea. Pharmaceutica Acta Helvetiae, 1998;72:301-05.
23. Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry, Chichester; 1991;3 (12): 3875-83.
24. Martins ER, Castro DM, CastellaniDC, Dias JE. Plantas Mediciniais. Viçosa. Editora UFV: Universidade Federal de Viçosa; 2000.
25. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. Nutr Rev. 1998;56(11):317-33.
26. Mann J. Secondary metabolism. Oxford: Clarendon Press; 1987.
27. Dixon RA, HarrisonMJ. Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense inplants. Advances in genetics; 1990;28:93.
28. Lopez RA, Sanches GJI, Hernandez HA, Sanchez YJ, Llanillo M. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. Chem Biol Interact 2006; 161(1):79-91.

29. Ahamd AA, Mahmoud AA, Williams HJ, Scott AI, Reibenspies JH, Mabry TJ. New sesquiterpene a-methylene lactones from the Egyptian plants *Jasoniacandicans*. Estados Unidos da América: Journal of natural products; 1993;56:1276-80.
30. Wagner H, Ulrich-Merzenich G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 2009;16: 97-110
31. Stefanović O, COMIE L. Synergistic antibacterial interaction between *Melissa officinalis* extracts and antibiotics. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2012;2(1):1-5.