

Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *rosmarinus officinalis* linn. (alecrim) sobre microrganismos cariogênicos

Antimicrobial and antiadherent activity, *in vitro*, of *rosmarinus officinalis* linn. (alecrim) extract tested on cariogenic microorganisms

Pollianna Muniz Alves¹, Jozinete Vieira Pereira², Jane Sheila Higino³, Maria do Socorro Vieira Pereira⁴, Lélia Maria Guedes Queiroz⁵

RESUMO

A atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato do alecrim (*Rosmarinus officinalis* Linn.) foram avaliadas sobre *Streptococcus mitis*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. sobrinus* e *L. casei*. O estudo foi realizado utilizando-se técnicas bacteriológicas. Os ensaios foram realizados pelas técnicas de ágar-difusão em placas para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e técnica dos tubos inclinados para a Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA). Os resultados mostraram a potencialidade da *Rosmarinus officinalis* Linn. na inibição do crescimento bacteriano e síntese de glucano, sugerindo a sua utilização, como meio alternativo, no controle de bactérias cariogênicas.

Descritores: Cariogênicos. Uso terapêutico. *Rosmarinus officinalis*. Biofilme.

INTRODUÇÃO

O biofilme dental é considerado o fator de maior importância dentro da etiologia das doenças bucais, como cáries, gengivites e periodontites, tendo uma relação muito grande com a higiene bucal deficiente¹⁻².

A formação do biofilme dental ocorre através de um processo ordenado e dinâmico onde há necessidade da fixação e proliferação de bactérias sobre as superfícies dos dentes³. A aderência bacteriana à película adquirida representa um dos primeiros mecanismos envolvidos na iniciação do desenvolvimento do biofilme dental⁴⁻⁵.

Devido a sua conduta contínua de agressão, o biofilme dental em cada etapa do seu desenvolvimento vai adquirindo novas espécies, dentre estas *Streptococcus mitis*, *Streptococcus*

mutans, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus casei*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*; que com sua patogenicidade irão provocar danos ao esmalte e tecido gengival⁶⁻⁷.

A remoção mecânica do biofilme dental constitui o método mais aceito para o seu controle, mas o uso de coadjuvantes químicos, como colutórios, em especial a clorexidina, é bastante valioso⁸⁻⁹.

Castro¹⁰ acrescenta que diante das dificuldades de manter os indivíduos motivados para realizar uma adequada limpeza da cavidade bucal, com o objetivo primário, em termos de saúde bucal, de controlar o biofilme dental é válido e necessário associar métodos químicos aos procedimentos mecânicos para o controle da microbiota.

¹ Doutoranda em Patologia Oral, UFRN

² Prof^a de Estomatologia, Dept. Odontologia, UEPB

³ Prof^a do Dept. Farmácia, UFPE

⁴ Prof^a de Genética dos Microrganismos, Dept. Biologia, UFPB

⁵ Profa. do Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral, UFRN

Inúmeras substâncias químicas vêm sendo pesquisadas, com o objetivo de inibir a formação e a progressão do biofilme dental¹¹⁻¹⁴. Dentre estas substâncias destacam-se, atualmente, os produtos de origem vegetal por se mostrarem potencialmente eficazes no que se refere a atividade antimicrobiana sobre bactérias cariogênicas, podendo atuar seletivamente sobre estas bactérias, além de inibir a síntese de glucanos pela inibição da glicosiltransferase¹²⁻¹³. Dentre estas se destaca a *Rosmarinus officinalis* Linn. (alecrim).

A *Rosmarinus officinalis* Linn. (alecrim) é um arbusto aromático perene, pertencente a família Labiatae, caracterizado por apresentar cerca de 1 metro de altura, ramos jovens que se tornam lenhosas ao maturar, e flores pequenas, agrupadas em densos ramos terminais. Seu óleo essencial é composto principalmente por hidrocarbonetos monoterpênicos, ésteres, terpenóides, flavonóides, fenóis, cânfora e â-cariofileno¹⁴.

O alecrim apresenta propriedade analgésica, espasmolítica, antiinflamatória, antifúngica e possível propriedade antineoplásica¹⁵⁻¹⁶, bem como atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus brevis* e *Pseudomonas fluorescens*¹⁶. Porém, são raros ou inexistentes os relatos da atividade antimicrobiana do extrato do alecrim sobre microrganismos do biofilme dental.

Assim sendo, o propósito deste estudo foi verificar *in vitro* a ação antimicrobiana do extrato da *Rosmarinus officinalis* Linn. contra *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus casei*, e analisar a capacidade de inibição da síntese de glucanos pelo *Streptococcus mutans*, presentes no biofilme dental.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Botânico e obtenção da matéria-prima

Foi utilizada a folha do alecrim (*Rosmarinus officinalis* Linn.). O material botânico foi obtido no mercado público de João Pessoa-PB, e identificado botanicamente no Laboratório de Toxicologia de Ciências Farmacêuticas da UFPE (Universidade Federal de Pernambuco – Recife). A partir daí, as folhas foram lavadas com água e posteriormente selecionadas para serem utilizadas na pesquisa. Em seguida a material foi levado à secagem em estufa a 33°C, durante uma semana, para eliminação de

umidade e estabilização do conteúdo enzimático. Passado este período o material foi triturado a pó em moinho elétrico e então submetido a processo de extração dos princípios ativos.

Extração dos Marcadores Químicos

O método de extração empregado foi a lixiviação ou percolação em fluxo contínuo à temperatura ambiente. Por se tratar de uma matéria rica em polifénóis de fácil modificação estrutural, não foi utilizada a extração à quente, preservando assim a estabilidade do material. Na lixiviação em fluxo contínuo utilizou-se um processo onde existe a renovação constante da solução extratora (solução hidroalcoólica a 80% v/v) durante um período de 24 horas. Decorrido este tempo o marcador ficou completamente esgotado (extração total dos marcadores ou princípios ativos). Nesta etapa, foram utilizados aproximadamente 8 litros de solução hidroalcoólica para 1 Kg de matéria prima seca e pulverizada, visando o completo esgotamento da droga. Recuperou-se um volume de aproximadamente 6.600ml de cada extrato que, após filtração para retirada das impurezas, foram acondicionados em frascos âmbar, limpos, secos e estocados em câmara fria.

Concentração da Solução Extrativa (Lixiviado)

A etapa seguinte foi a concentração da solução em nível de extrato fluido 1:1 (p/v). O procedimento para a concentração do extrato foi realizado em rota-vapor Modelo Ika-Werk® (EUROSTAR) a uma temperatura constante de 45° C. O extrato obtido apresentou um pH ácido, em torno de 4,74.

Linhagens bacterianas

Utilizou-se no presente trabalho linhagens bacterianas padronizadas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus mitis* (ATCC 9811), *Streptococcus sanguis* (ATCC 10557), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 27609) e *Lactobacillus casei* (ATCC 7469).

Determinação da Atividade Antimicrobiana do Extrato da *Rosmarinus officinalis* Linn.

A atividade antimicrobiana em placas foi determinada pelo método de difusão em meio sólido para o screening e para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato da *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre as linhagens bacterianas. As linhagens foram cultivadas em caldo

nutritivo (BHI-Brain Heart Infusion-DIFCO) e incubadas a 37°C por 18-20 horas em microaerofilia. Foram realizadas perfurações no meio de cultura (Agar Mueller Hinton – DIFCO, acrescido de sacarose à 5%) de aproximadamente 6mm de diâmetro. Nos orifícios foi colocado um volume de 50 µl da solução do extrato diluído, variando de 1:1 a 1:512. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por um período de 24 horas. Os mesmos procedimentos foram realizados com o gluconato de clorexidina à 0,12% (controle positivo), bem como com uma solução hidroalcoólica à 80% (controle negativo). Foi considerada como CIM a menor concentração do extrato que inibiu completamente o crescimento bacteriológico.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Aderência

A concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) da bactéria ao vidro foi determinada na presença de sacarose a 5%, usando-se concentrações crescentes e dobradas da solução diluída do extrato, variando de 1:1 a 1:512. A partir do crescimento overnight as linhagens foram subcultivadas a 37°C em caldo Müeller-Hinton (DIFCO), em microaerofilia, por um período de 40 min obtendo-se um inóculo de 10⁶ UFC/ml. A incubação foi feita a 37°C por 24 horas em microaerofilia, com os tubos inclinados a 30°. Os mesmos procedimentos também foram realizados com o gluconato de clorexidina à 0,12% (controle positivo), bem como com uma solução hidroalcoólica à 80% (controle negativo). A CIMA foi definida como a menor concentração do

agente antibacteriano que impediu a aderência bacteriana ao tubo de vidro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, os fitofármacos têm assumido um papel importante como meio terapêutico alternativo na odontologia, mediante as suas propriedades antimicrobianas frente as afecções bucais, principalmente as decorrentes do biofilme dental. Gebara, Zardetto Mayer¹² e Pereira et al.¹⁷ afirmam que extratos de plantas têm inibido o crescimento de *Streptococcus mutans* no biofilme dental, patógeno altamente importante na etiologia da cárie.

No presente estudo buscou-se verificar a ação do extrato hidroalcoólico do *Rosmarinus officinalis* Linn., sobre espécies de microrganismos microaerófilos predominantes no biofilme supragengival: *Streptococcus mutans*, *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. sobrinus*.

Nossos resultados demonstraram que as linhagens bacterianas de *Streptococcus mutans*, *S. mitis*, *S. sobrinus* e *Lactobacillus casei*, mostraram ser susceptíveis a ação do extrato hidroalcoólico da *Rosmarinus officinalis* Linn., observando-se halos de inibição que variaram entre 11 e 20 mm. O extrato do alecrim não apresentou atividade antimicrobiana sobre a linhagem de *S. sanguis*. A inibição do crescimento apresentou-se homogênea, de acordo com o grau de concentração do extrato em estudo. Houve uma diminuição proporcional dos halos de inibição a medida que a concentração do extrato foi diminuída, conforme dados apresentados na tabela 1.

Tabela 1- Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio sólido do extrato hidroalcoólico do alecrim sobre microrganismos cariogênicos.

Linhagens bacterianas	Diâmetro dos halos de inibição (mm)									
	Concentração do extrato (mg/ml)									
	EP	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
<i>S. mutans</i>	20	18	15	12	11	0	0	0	0	0
<i>S. mitis</i>	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. sobrinus</i>	16	14	12	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. sanguis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. casei</i>	17	15	14	12	11	0	0	0	0	0

EP= Extrato Puro

Em relação ao controle positivo (gluconato de clorexidina à 0,12%), observa-se que também inibiu o crescimento de todas as linhagens analisadas, mas com halos de inibição que variaram de 11 a 18

mm (Tabela 2). Sobre o *L. casei* sua CIM foi na diluição de 1:8, enquanto que a CIM do alecrim sobre o mesmo microrganismo foi de 1:16. Ou seja, o extrato do alecrim apresentou maior capacidade de

inibição em menores concentrações sobre este microorganismo. Fato de grande importância, pois se sabe que o *L. casei* é o microorganismo responsável

pela consolidação e aumento da consistência do biofilme. E quando associado ao *S. mutans* contribui no processo de formação da cárie dentária.

Tabela 2- Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio sólido do gluconato de clorexidina a 0,12% sobre microrganismos cariogênicos.

Linhagens bacterianas	Diâmetro dos halos de inibição (mm)									
	Concentração da clorexidina (ml/ml)									
	SD	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
<i>S. mutans</i>	16	15	14	13	12	11	0	0	0	0
<i>S. mitis</i>	15	15	14	14	13	0	0	0	0	0
<i>S. sobrinus</i>	16	16	15	14	12	11	0	0	0	0
<i>S. sanguis</i>	17	16	14	13	12	11	0	0	0	0
<i>L. casei</i>	18	17	15	11	0	0	0	0	0	0

SD= Sem Diluição

Não se observou nenhum resultado positivo de indicação para o controle negativo.

Em estudo realizado por Sampaio¹⁸ o extrato das folhas do alecrim (*Rosmarinus officinalis* Linn.) apresentou atividade antimicrobiana sobre linhagens de *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus faecalis*. No entanto, na literatura são inexistentes pesquisas quanto a atividade do alecrim sobre os microrganismos formadores do biofilme dental.

Sabe-se que a adesão das bactérias às superfícies dentais constitui um processo complexo multifatorial, influenciado pelo ambiente bucal, morfologia dental, superfície bacteriana, e hábitos do hospedeiro e superfície do substrato¹⁹.

De acordo com Pereira et al.³ vários fatores estão associados a esse processo, dentre estes, a interação de proteínas, adesinas, lectinas e interações hidrofóbicas. Desta forma, a interferência com a adesão bacteriana nas superfícies dos dentes pode ser um caminho para se obter o controle do biofilme dental, e conseqüentemente prevenir a instalação de patologias orais utilizando produtos que contenham extrato de alecrim.

Poucos estudos relatam a influência dos agentes antimicrobianos nos estágios iniciais de

formação do biofilme dental, especialmente com relação a seu efeito sobre os fatores envolvidos na aderência bacteriana à película adquirida^{3, 19-20}.

Neste estudo o extrato do *Rosmarinus officinalis* Linn. foi efetivo na inibição da aderência de quatro linhagens bacterianas, dentre as cinco analisadas, não apresentando efeito antiaderente sobre o *S. sanguis*, representada pela ausência de aderência ao vidro. Particularmente a maior eficácia do extrato foi observada sobre o *S. mutans*, cuja CIMA foi de 1:32 (Tabela 3). Resultado este de grande importância tendo em vista que o *S. mutans* é o microorganismo do biofilme dental que apresenta maior potencial cariogênico^{2,12}. Estudos comparativos utilizando o extrato do alecrim não foram encontrados na literatura.

O estudo comparativo da ação do extrato da *Rosmarinus officinalis* Linn. com o gluconato de clorexidina à 0,12%, mostrou semelhantes atividades de inibição da síntese de glucano quando considerado o *L. casei* (1:16). Por outro lado, para o *S. Mutans*, o extrato de alecrim mostrou maior atividade antiaderente (1:32), quando comparado ao controle positivo (1:16) (Tabela 3).

Tabela 3- Dados comparativos da Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) do extrato do *Rosmarinus officinalis* Linn.. (alecrim) sobre *Streptococcus mutans*, *S. mitis*, *S. sobrinus*, *S. sanguis* e *L. casei*.

Linhagens bacterianas	Alecrim	Clorexidina (Controle Positivo)	Solução hidroalcoólica (controle negativo)
<i>S. mutans</i>	1:32	1:16	0
<i>S. mitis</i>	1:8	1:16	0
<i>S. sobrinus</i>	1:8	1:16	0
<i>S. sanguis</i>	0	1:16	0
<i>L. casei</i>	1:16	1:16	0

Os resultados observados neste estudo são promissores uma vez que os microrganismos analisados são importantes na etiologia da cárie. E mostram também a importância das indicações terapêuticas das plantas medicinais como método alternativo e de baixo custo na clínica odontológica, uma vez que o extrato hidroalcolico do alecrim apresentou potencial atividade antimicrobiana sobre os microrganismos presentes no biofilme dental, como também demonstrou *in vitro* inibição de aderência bacteriana na superfície, fator predisponente para o desenvolvimento da cárie e doenças periodontais.

A utilização da fitoterapia na odontologia é muito mais do que uma alternativa econômica, de fácil acesso e terapêutica para a população. O que se busca atualmente, e na maioria das vezes, é validar cientificamente o conhecimento popular no uso das plantas, que, quando feito de maneira correta, é sem dúvida menos agressivo ao homem que os medicamentos alopáticos.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados encontrados pode-se concluir que o *Rosmarinus officinalis Linn.* apresentou potencialidade na inibição do crescimento bacteriano, formando halos de inibição que variaram entre 11 e 18mm, sobre todos os microrganismos analisados; bem como inibição na síntese de glucano, em concentrações de 1:32, especificamente sobre o *S. mutans*. Sugere-se assim, o desenvolvimento de estudos farmacológicos *in vivo* para que desta forma o alecrim possa ser definitivamente utilizado, como meio alternativo, no controle do biofilme dental.

ABSTRACT

The antibacterial and antiadherence activities, *in vitro*, of *Rosmarinus officinalis Linn.* extract (known as “aroeira-do-sertão”) were tested on *Streptococcus mitis*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. sobrinus*, and *L. casei*. The present study was performed using bacteriological techniques. The tests were carried out using inundation techniques in Petri dishes to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and inclined tube techniques to determine the Minimum Inhibitory Concentration of Adherence (MICA). The results showed that the *Rosmarinus officinalis Linn.* extract has the potential to inhibit oral bacterial growth and glucan synthesis and can be used as an effective antibacterial alternative agent against cariogenic bacteria.

Uniterms: Cariogenic agents. Therapeutic use. *Rosmarinus officinalis*. Biofilm.

REFERÊNCIAS

- 1- Cerri A, Marti DPFL, Werneck CE. Noções sobre o uso da clorexidina na prevenção e controle das doenças bucais infecciosas. *J Bras Endodontia* 2000; 1:35-8.
- 2 - Pereira CV. Ação de amostras de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* sobre diferentes carboidratos com ênfase dentária – estudo *in vitro*. *RFOUPF*. 1999; 4:33-9.
- 3- Pereira JV, Pereira MSV, Sampaio FC et al. Efeito antibacteriano e antiaderente *in vitro* do extrato da *Punica granatum Linn.* sobre microrganismos do biofilme dental. *Rev Bras Farmaco*. 2006; 16:88-93.
- 4- Almeida PF. Microbióta estreptocócica associada com a formação inicial da placa dental. *Rev Ciênc Med Biol*. 2002; 1:33-41.
- 5- Modesto A, Lima KC, Uzeda M. Atividade antimicrobiana de três dentrífcios utilizados na higiene oral de bebês: estudo *in vitro*. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 2001; 55:43-8.
- 6- Peres DHDF. Prevalência de Streptococcus do grupo mutans (Egm) em crianças de 8 a 60 meses nas creches de Joinville-SC. *J Bras Odontopediatr Odontol Bebê* 2003; 6:36-40.
- 7- Monfrin RCP, Ribeiro MC. Avaliação *in vitro* de anti-sépticos bucais sobre a microbiota da saliva. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 2000; 54:400-7.
- 8- Jardim Jr EG, Pedrini D, Xavier, EA, Jardim, PS. Eficácia do listerine sobre a placa. *RGO* 1998; 46:70-8.
- 9- Stefani CM, Lima AFM. Avaliação dos efeitos clínicos da aplicação de gel de clorexidina em pacientes sob tratamento ortodôntico. *Rev Periodontia*. 1996; 5:300-5.
- 10- Castro SL. “*In vivo*” Study efficacy of anti septics on microaerobic microorganisms of the oral cavity. *Rev Dent*. 2001; 1:1-9.
- 11- Rodrigues Jr. AL. Redução do Índice de placa com Listerine. Avaliação do índice de placa em relação ao uso de Listerine e/ou escovação. *RGO* 1998; 46:101-8.
- 12- Gebara ECE, Zardetto CGDC, Mayer MPA. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S.mutans* e *S.sobrinus*. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 1996; 10:251-6.

- 13- Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J Natural Products* 1996; 59:205-15.
- 14- Alonso. Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas. Buenos Aires: ISIS Ediciones SRL, 1998.
- 15- ArrudaTA. Estudo etnofarmacobotânico e atividade antimicrobiana de plantas medicinais. (Dissertação). Campina Grande, Paraíba: Universidade Estadual da Paraíba. 2002. 94p.
- 16- Amorim JA. Fitoterapia popular e saúde da comunidade: diagnóstico para proposta de integração nos serviços de saúde em Campina Grande, PB, Brasil. (Tese) Bauru, São Paulo: Universidade de São Paulo. 1999. 170p.
- 17- Pereira JV, Pereira MSV, Higino JS, Sampaio FC, Alves PM, Araújo, CRF. Estudos com o extrato da *Punica Granatum* Linn. (romã): efeito antimicrobiano in vitro e avaliação clínica de um dentrífcio sobre microrganismos do biofilme dental. *Rev Odonto Ciênc.* 2005; 20:262-9.
- 18- Sampaio FC. Fitoterapia em Odontologia. Memento fitoterápico. As plantas como alternativa terapêutica; conhecimentos populares e científicos. João Pessoa: Universitária, 1997. 202p.
- 19- Alves PM, Pereira JV, Higino JS, Pereira MSV, Queiroz LMG. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro da aroeira-do-sertão sobre o biofilme dental. *RBO* 2006; 63:271-4.
- 20- Van Loveren C, Buijs JF, Ten Cate JM, 2000. The effect of triclosan toothpaste on enamel demineralization in a bacterial demineralization model. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 45:153-8.