

Faculdade de Odontologia da
Universidade Federal de Minas Gerais

ARQUIVOS EM ODONTOLOGIA

ARQUIVOS EM ODONTOLOGIA. - v. 44 n°4 (Outubro/Dezembro) 2008.
Belo Horizonte: Faculdade de Odontologia da UFMG, 1974.

Trimestral

Continuação de: Arquivos dos Centros de Estudos na Faculdade de Odontologia da UFMG

1. Odontologia - Periódicos. I. Faculdade de Odontologia da UFMG.

CDD-617.6.

BLACK-D05

Indexado/Indexed by:
BBO - Bibliografia Brasileira de Odontologia
LILACS - Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde

Solicita-se permuta/Exchange desired

Correspondências para/Contact to:

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Odontologia
Arquivos em Odontologia
Secretaria do Colegiado do Programa de
Pós-Graduação em Odontologia da UFMG - CPGO
Av. Antônio Carlos, 6627 - Sl.3312 Pampulha
Fone: (31) 3409 2470 - Fax: (31) 3409 2472
31270-901 - Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasil
E-mail - odontoarquivos@gmail.com

Faculdade de Odontologia da
Universidade Federal de Minas Gerais

ARQUIVOS EM ODONTOLOGIA

Efeito antimicrobiano do extrato da *lippia sidoides Cham.* sobre microrganismos cariogênicos

Antimicrobial effect of the *lippia sidoides Cham.* extract on cariogenic microorganisms

Ana Carolina Lyra de Albuquerque¹, Maria do Socorro Vieira Pereira², Jozinete Vieira Pereira³, Maria Regina Macedo Costa⁴, Jane Sheila Higino⁵

RESUMO

É fato comprovado que a maior parte das doenças que acomete a cavidade bucal é de origem infecciosa. Várias categorias de agentes químicos têm sido utilizadas no controle químico de biofilme dental, através de estratégias que visem a redução da adesão bacteriana, inibição do crescimento e proliferação dos microrganismos na superfície do dente. A *Lippia sidoides Cham.* (alecrim-pimenta) é uma planta do Nordeste do Brasil, cujo óleo essencial confere a esta planta forte ação anti-séptica contra fungos e bactérias. A presente pesquisa objetivou avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato da folha da *Lippia sidoides Cham.* sobre microrganismos do biofilme dental. Diante dos resultados alcançados, podemos afirmar que: o extrato da *Lippia sidoides Cham.* possui atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados.

Descritores: *Lippia sidoides*. Placa dentária. Susceptibilidade antimicrobiana.

INTRODUÇÃO

É por um processo ordenado e dinâmico de fixação, proliferação e aderência de bactérias sobre as superfícies dentárias que se dá a formação do biofilme. Em torno de 400 espécies de bactérias têm sido isoladas do biofilme dental, mas somente poucas espécies são capazes de induzir doença inflamatória¹.

Os dois grupos de bactérias, principais causadores da cárie dentária são os *Streptococcus* do grupo mutans e *Lactobacillus sp.*². Esses são os principais responsáveis pela cárie de superfície lisa, uma vez que possuem a capacidade de aderir, colonizar, crescer, sintetizar polissacarídeos extracelulares e produzir ácidos na superfície dos dentes³.

Quando a remoção mecânica do biofilme é deficiente e a utilização da sacarose é freqüente, ocorre uma seleção para certos organismos patogênicos e o biofilme se torna virulento, podendo resultar tanto em lesões de tecido duro, quanto de tecido mole.

Todavia, deve-se lembrar das dificuldades em se conseguir que os pacientes mantenham um

adequado controle mecânico. Por conseguinte, substâncias antimicrobianas poderiam tentar compensar a desmotivação para uma boa higienização dos dentes⁴.

Muitos trabalhos têm avaliado as propriedades antimicrobianas de substâncias indicadas na prevenção e controle do biofilme e da cárie. Algumas como a clorexidina e os fluoretos são bastante difundidas na literatura científica; outras ainda pouco exploradas, como os extratos vegetais⁵.

A clorexidina é uma das mais efetivas e seguras devido a sua forte absorção pelas superfícies bucais, sendo liberada gradativamente dos sítios de ação, podendo reduzir o crescimento e metabolismo do biofilme dental, assim como o potencial de aderência dos microrganismos⁶.

Embora seja um excelente antimicrobiano, devido a seus efeitos colaterais, não é recomendado seu uso prolongado. Daí a necessidade de se buscar novas substâncias que sejam eficazes no controle da microbiota bucal, mas sem efeitos colaterais⁴ como observados para a clorexidina.

¹Doutoranda em Diagnóstico Bucal, UFPB

²Profª. Adjunta, Dept. Biologia Molecular, UFPB

³Profª. Titular, Dept. Odontologia, UEPB

⁴Graduanda de Odontologia, UFPB

⁵Profª. Adjunta, Dept. Farmácia, UFPE

Contato: lina.lyra@gmail.com

Os antimicrobianos naturais podem contribuir no controle do crescimento da microbiota oral contornando transtornos propiciados por cepas resistentes aos antimicrobianos convencionais. Entre as vantagens dos fitoterápicos que justificam seu uso podemos citar: efeito sinérgico, devido aos vários fitoconstituintes que atuam melhor em associação; associação de mecanismos por compostos atuando em moléculas alvos diferentes, proporcionando ações diversificadas em todo o organismo; menos riscos de efeitos colaterais, devido às baixas concentrações em que os princípios ativos se apresentam nas plantas, sem considerar correlações dose-tempo; menores custos de pesquisa, quando se compara ao desenvolvimento de um novo fármaco⁷.

Devido à sua diversidade vegetal, o Brasil é um país conhecido mundialmente pela variedade de produtos vegetais, despertando o interesse científico, e no qual estão localizadas cerca de 20% das 250 mil espécies medicinais catalogadas pela Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO), facilitando o aproveitamento do potencial curativo dos vegetais para o tratamento de doenças, inclusive na Odontologia⁸.

Os extratos de plantas possuem em sua composição substâncias anticariogênicas que podem suprimir o crescimento de bactérias na cavidade bucal inibindo a síntese de glucano a partir da sacarose pela glicosiltransferase⁹.

A utilização das plantas pela medicina popular, seu uso na Odontologia e a divulgação dos êxitos conduziram a exploração científica, proporcionando um conhecimento químico-farmacológico de milhares de plantas.

No Brasil, a importância da medicina alternativa é extremamente relevante, principalmente por que sua zona rural é bastante extensa e muito rica no tocante às propriedades farmacológicas de sua variada flora. Na história da medicina popular a própolis pode ser considerada como um dos mais eficientes medicamentos naturais descobertos¹⁰. Estudos avaliaram o efeito clínico de solução anti-séptica à base de própolis em crianças cárie ativas, onde foram coletados os índices para acúmulo de biofilme oral (IHO-S) e de doença gengival (IG) antes e 24 horas após o uso das soluções. Os resultados demonstraram significativa redução do número de *Streptococcus mutans* após o uso da solução de própolis, não diferindo da solução de clorexidina ($p > 0,05$) a qual possui efeitos colaterais como pigmentação dos dentes, interferência gustativa,

descamação da mucosa e resistência de germes quando de seu uso prolongado⁵.

O efeito antimicrobiano do extrato hidroalcoólico da *Punica granatum Linn.* foi avaliado sobre três linhagens bacterianas predominantes na formação do biofilme supragengival (*Streptococcus mitis*, *S. mutans* e *S. sanguis*), dos quais todos foram sensíveis ao extrato da romã, mostrando a importância e a necessidade de se avaliar meios alternativos e economicamente viáveis para o controle do biofilme, sugerindo a utilização da fitoterapia, dentro de programas preventivos e curativos importantes à população¹¹.

A *Lippia sidoides Cham.* é uma planta do nordeste do Brasil, da família *Verbenaceae*. Seu óleo essencial contém principalmente timol e carvocol, que confere a esta planta forte ação anti-séptica contra fungos e bactérias¹². Ela foi caracterizada como matéria prima para uso em produtos farmacêuticos quando se realizou ensaios de perda por dissecação, teor de óleo essencial e perfil cromatográfico, visando à variação de sua utilização e a caracterização de sua identidade¹³.

A fitoterapia é a área do conhecimento que busca a cura das doenças através das plantas medicinais e apesar de seu uso ter uma propagação associada ao conhecimento popular empírico, paulatinamente vem sendo reconhecido e incorporado ao saber científico¹⁴. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo avaliar comparativamente a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato da folha da *Lippia sidoides Cham.* comparando à Clorexidina 0,12% sobre os microrganismos: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus sp.*, principais agentes responsáveis pela formação do biofilme dental supragengival e, conseqüentemente, da cárie dentária.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Botânico

A matéria prima (folhas) da *Lippia sidoides Cham.*, no início da floração, foram coletadas no Horto de plantas medicinais do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal da Paraíba e foram secas em estufa a 40° C.

Obtenção dos Extratos

A obtenção dos extratos foi realizada no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco.

Para a extração foi empregado o método de lixiviação em fluxo contínuo à temperatura ambiente. A extração ocorreu através da solução extratora de álcool metanol (a 80% v/v), renovada constantemente por um período de 24 horas, pela qual se obteve um concentrado a 500 mL.

Linhagens Bacterianas

Foram utilizadas no presente trabalho linhagens bacterianas padronizadas de *Streptococcus mitis* ATCC 9811, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10557, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 e *Lactobacillus casei* ATCC 7469.

Determinação da Atividade Antimicrobiana do Extrato Hidroalcoólico da *Lippia sidoides* Cham.

A atividade antimicrobiana em placas foi determinada pelo método de difusão em meio sólido^{15,16}, para o screening e para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos hidroalcoólicos de *Lippia sidoides* Cham. sobre as linhagens bacterianas. As linhagens foram cultivadas em caldo nutritivo BHI (*Brain Heart*

Infusion- DIFCO-USA), incubadas a 37°C por 18-20 horas em microaerofilia. Placas de Agar *Mueller Hinton* (DIFCO-USA) foram preparadas e após 24 horas para controle de esterilidade, foram inundadas com solução salina inoculada com microrganismos cultivados *overnight*, em concentração de 10⁻¹ e a seguir, foram abertos, no meio de cultura, dez orifícios de aproximadamente 6mm de diâmetro, os quais correspondiam ao número da diluição da substância teste (1:1 até 1:1024). Em cada orifício colocou-se um volume de 50 µl da solução do extrato nas diluições de estudo. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por um período de 24 horas. Cada ensaio foi realizado em duplicata frente a cada linhagem selecionada. O mesmo procedimento foi utilizado para o controle positivo, com o gluconato de clorexidina (Periogard®). Após 24 horas os halos de inibição observados foram medidos (Figuras 1 A e B).

Foi considerada como CIM (Concentração Inibitória Mínima) a menor concentração do extrato capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano.

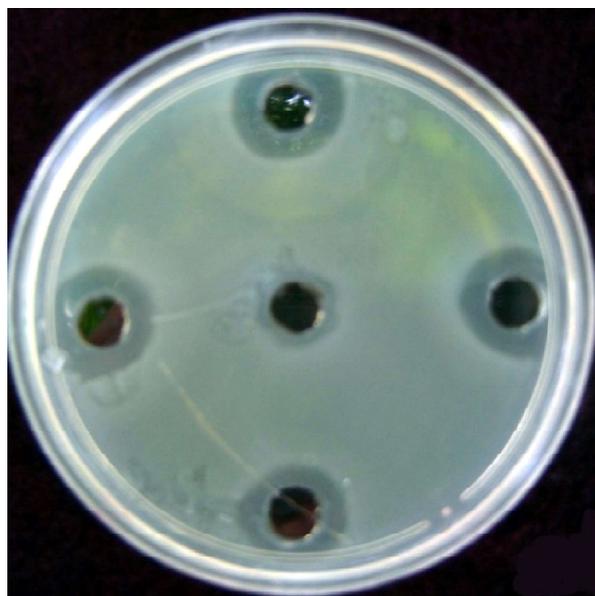
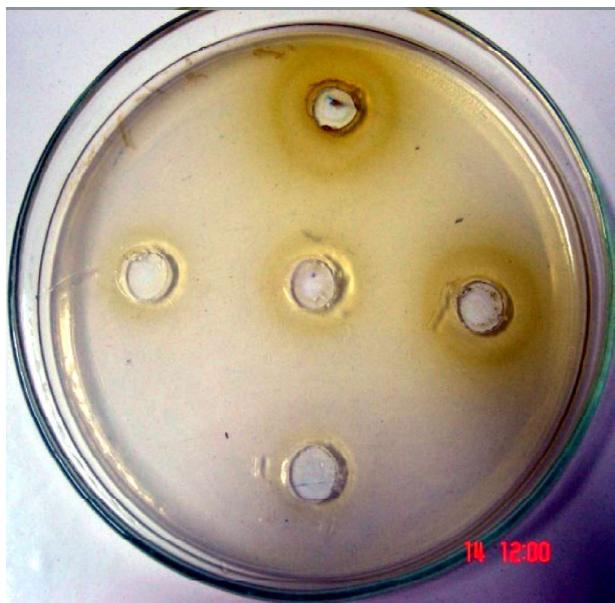


Figura 1 - A: Halos de inibição do Extrato de *Lippia sidoides* frente ao *Streptococcus mitis*; **B:** Halos de inibição da Clorexidina 0,12% frente ao *Streptococcus mutans*.

RESULTADOS

Tabela 1 - Diâmetros dos halos de inibição do Extrato de *Lippia sidoides Cham.* e Clorexidina 0,12%

MICROORGANISMOS	DIÂMETRO DOS HALOS (em mm) CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO (g/mL)									
	<i>Lippia sidoides Cham.</i>					Clorexidina 0,12%				
	EP	1:2	1:4	1:8	1:16	SP	1:2	1:4	1:8	1:16
	20	15	14	0	0	21	18	14	12	0
	23	16	0	0	0	20	19	15	13	0
	22	0	0	0	0	21	19	14	13	0
	16	14	0	0	0	19	18	15	12	0
	16	14	0	0	0	21	19	15	13	0

EP: Extrato Puro/SP: Substância Pura

Rev Fac Odontol São José dos Campos. 2000;3(2).

DISCUSSÃO

O biofilme dental é considerado como principal fator etiológico da cárie e doença periodontal. A busca por recursos alternativos já é uma realidade, visto as vantagens expostas justificasse, portanto, a necessidade de se estudar a ação de fitoterápicos sobre os microrganismos formadores do biofilme dental, uma vez que a *Lippia sidoides Cham.* (alecrim-pimenta) é uma planta encontrada na região Nordeste e comumente utilizada pela população.

Em estudos recentes foram identificados 24 constituintes químicos no óleo essencial de *L. sidoides*, que foi extraído através de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger e analisado em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectômetro de massas. Dentre os constituintes encontrados estavam o mirceno (11,92%), α -terpineno (5,68%), p-cimeno (31,57%), timol (20,45%), e α -cariofileno (15,75%). No mesmo estudo testou-se 20 μ L de óleo essencial a uma concentração de 20mg/mL em solução a 50% de dimetilsulfóxido (DMSO) mais 50% de água destilada estéril, avaliando-se sua ação antimicrobiana realizada pelo método de difusão em agar. Dentre os microrganismos ensaiados, o *Bacillus bulgaricus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* e *Candida albicans* foram sensíveis ao óleo essencial enquanto nenhuma atividade foi observada em relação à *Pseudomonas aeruginosa*¹⁷.

As atividades antibacterianas e antifúngicas da *Lippia sidoides Cham.* foram estudadas sobre a

microbiota cutânea e observou-se que seus principais princípios ativos (Timol e Carvocrol) foram fortemente anti-sépticos¹⁸.

A atividade antimicrobiana de vários óleos essenciais de plantas nordestinas foi avaliada contra bactérias do gênero *Streptococcus*, isoladas da microbiota oral, e o Alecrim-pimenta, por ser o mais ativo naquele trabalho, foi escolhido para a preparação do anti-séptico bucal no estudo, obtendo-se como resultado uma redução de 6% de placa bacteriana e inibição de formação de placa dental em 12% nos indivíduos submetidos à pesquisa. O extrato hidroalcoólico das folhas da planta Alecrim-pimenta é usado popularmente para combate à gengivite no Nordeste brasileiro²¹.

Verificou-se a compatibilidade biológica do extrato hidro-alcoólico da *Lippia sidoides Cham.* frente ao tecido subcutâneo de ratos. Ao final dos experimentos, constatou-se que o mesmo foi bem tolerado pelo tecido subcutâneo dos animais²². *Lippia sidoides Cham.* também tem seu efeito sobre a redução da presença de gengivite marginal em cães comprovado e sua eficácia sobre o biofilme dental já foi avaliada em humanos^{23,24}.

Estudo avaliou a efetividade do óleo essencial da *Lippia sidoides Cham.* na inibição do crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus* com diferentes perfis de resistência antibiótica isoladas de material clínico. Os resultados mostraram destacável atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia sidoides* notada por grandes halos de inibição do crescimento bacteriano (15-21 mm) suportando a possibilidade de seu uso racional como agente antimicrobiano alternativo²⁰.

Neste estudo, o extrato da *Lippia sidoides Cham.* formou halos de inibição que variaram de 16 a 23mm. O *Streptococcus mitis* foi o mais sensível formando halos de inibição de 23mm, em seguida vindo o *S. sanguinis* e o *S. mutans*, fato que deve ser observado, já que os *Streptococcus* são o gênero predominante na cavidade bucal¹⁹. (Tabela 1 / Figura 1).

A clorexidina é uma das mais efetivas e seguras substâncias utilizadas na Odontologia, principalmente por que reduz o crescimento e metabolismo do biofilme dental⁶.

Com relação aos ensaios da atividade antimicrobiana realizados com o gluconato de Clorexidina, todas as linhagens ensaiadas foram sensíveis, observando-se maiores halos de inibição no *S. mutans* (21mm), *S. sanguinis* (21mm) e *L. casei* (21mm). A Clorexidina é um dos mais efetivos e seguros antimicrobianos devido a sua forte absorção pelas superfícies bucais, sendo liberada gradativamente dos sítios de ação, podendo reduzir o crescimento e metabolismo do biofilme dental, assim como o potencial de aderência dos microorganismos²⁵; a substância atua na desorganização geral da membrana celular e inibição específica de enzimas da membrana; inibe a incorporação de glicose pelos *Streptococcus mutans* e seu metabolismo para ácido lático²⁶.

A utilização das plantas pela medicina popular, seu uso na Odontologia e a divulgação dos êxitos conduziram a exploração científica, podendo os antimicrobianos naturais estudados contribuir no controle do crescimento da microbiota oral^{7,10}.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados alcançados, podemos afirmar que o extrato de *Lippia sidoides Cham.*, possui atividade antimicrobiana *in vitro* frente aos microrganismos do biofilme dental: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus casei* quando comparado à Clorexidina 0,12%. Os resultados apresentados são bastante promissores, uma vez que demonstraram potencial atividade antimicrobiana do extrato vegetal ensaiado, o que gera perspectivas futuras na continuidade deste estudo através de ensaios clínico-toxicológicos, inclusive *in vivo*, contribuindo para a utilização destes agentes na clínica em Odontologia como forma alternativa e de baixo custo na prevenção e tratamento de afecções orais na população.

ABSTRACT

It is a proven fact that most illnesses involving the buccal cavity are of an infectious origin.

Many categories of chemical agents have been used in the chemical control of biofilms, by means of strategies aimed at the reduction of the bacterial adhesion, the inhibition of growth, and the proliferation of microorganisms on tooth surfaces. The *Lippia sidoides Cham.* is a plant from the northeastern regions of Brazil, whose main oil provides the plant with a strong anti-septic action against fungi and bacteria. This research aimed to evaluate the *in vitro* antimicrobial activity of *Lippia sidoides Cham.* extract on microorganisms of dental biofilm. Considering the results achieved in this study, it can be concluded that the *Lippia sidoides Cham.* extract does in fact possess antimicrobial activity against to the microorganisms tested.

Uniterms: *Lippia sidoides*. Dental plaque. Antimicrobial susceptibility.

REFERÊNCIAS

1. Havemose-poulsen A, Holmstrup P. Factors affecting IL-1-mediated collagen metabolism by broblasts and pathogenesis of periodontal disease: a review of the literature. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997;8:217-36.
2. Featherstone JDB The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc.* 2000;131:887-99.
3. Fukushima K, Motada R, Ikeda T. Effects of exogenous insoluble glucan primer on insoluble glucan synthesis by *Streptococcus mutans*. *J Dent Res.* 1981;67:51-5.
4. Torres CRG. Antimicrobial agents and your potential of use in odontology. *Pós-Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos* 2000;3.
5. Almeida RVD. Efeito clínico de solução anti-séptica a base de própolis em crianças cáries ativas. *Pesq Bras Odontopediatria Clín Integr.* 2006; 6:87-92.
6. Vinholis AHC. Mecanismo de ação da clorexidina. *Rev Period.* 1996;5:281-3.
7. Yunes RA, Pedrosa R, Cechinel V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova* 2001;4:147-52.
8. Nunes DA. A utilização de agentes fitoterápicos em Odontologia. *Rev Fac Odontol UFBA* 1999;28:11-4.
9. Haslam E. Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. *J Nat Prod.* 1996;59:205-15.

10. Geraldini CA, Salgado EG, Rode SM. Ação de diferentes soluções de própolis na superfície dentinária-avaliação ultra-estrutural. Rev Fac Odontol São José dos Campos. 2000;32.
11. Pereira JV. Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da *Punica granatum* Linn. sobre microorganismos formadores da placa bacteriana. Pesq Bras Odontopediatria Clín Integr. 2004;4:265.
12. Radünz LL. Secagem em camada delgada de folhas de *Lippia sidoides* Cham. In: Anais do XXX Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola. Paraná: 2001.
13. Nunes RS. Caracterização da *Lippia sidoides* Cham. (Verbanaceae) como matéria primavegetal para uso em produtos farmacêuticos. Scientia Plena. 2005;1.
14. Dantas IC. Plantas medicinais comercializadas no município de Campina Grande. Paraíba: 2006.
15. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1969;45:493-6.
16. National Comitte For Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelth informetional suplement. 2002;22-1.
17. Feitosa JG. Avaliação antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia sidoides* realizada pelo método de difusão em placa. In: Anais da 28ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química. 2005.
18. Lacoste E. Lês propriétés aniseptiques de l'huile essentielle de *Lippia sidoides* Cham. Aplicacion à la microflora cutanée. 1996.
19. Lorenzo JL. Microbiologia para o estudante de Odontologia. São Paulo: Atheneu; 2004.
20. Oliveira FP. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. Rev Bras Farm. 2006;16:510-6.
21. Filho ES. Preparação e avaliação clínica de um anti-séptico bucal à base do óleo essencial da planta medicinal *Lippia sidoides* Cham.(Alecrim pimenta). Rev ABO Nac. 1998;6:5-10.
22. Couto GB. Biocompatibilidade do extrato hidroalcoólico da *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae) / Biocompatibility of the *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) hidro-alcoholic essence. Rev Cons Reg Odontol Pernambuco. 2000;3:83-90.
23. Girão VC. A clinical trial of effect of a mouth-rinse prepared if *Lippia Sidoides* Cham essential oil in dogs with gingival disease. Prev Vet Med. 2003;95-102.
24. Fernandes-Filho ES. Preparação e avaliação clínica do óleo essencial da planta medicinal *Lippia sidoides* Cham.(Alecrim pimenta). Rev ABO Nac. 1998;6:323-5.
25. Vinholis AH. Mecanismo de ação da clorexidina. Rev Period. 1996;5:281-3.
26. Torres CR. Antimicrobial agents and your potential of use in odontology. Rev Fac Odontol São José dos Campos 2000;3:12-5.