



CENTRO UNIVERSITÁRIO DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

TÁBATA RESQUE BECKMANN CARVALHO

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE LIPPIA
THYMOIDE, FRENTE A CEPA DE P. INTERMÉDIA**

Belém
2018

CENTRO UNIVERSITÁRIO DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

TÁBATA RESQUE BECKMANN CARVALHO

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE LIPPIA
THYMOIDE, FRENTE A CEPA DE P. INTERMÉDIA**

Dissertação apresentada para defesa de
mestrado no Programa de Pós-graduação em
clínica Odontologia do centro universitário do
Pará

Orientador: Prof. Dr. Silvio Augusto
Fernandes de Menezes.

Belém
2018

CENTRO UNIVERSITÁRIO DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

TÁBATA RESQUE BECKMANN CARVALHO

Data:

Conceito:

Banca examinadora:

Prof. Dr. Silvio Augusto Fernandes de Menezes (Orientador)
Centro Universitário do Pará

Profa. Dra Mileide da Paz Brito
Centro Universitário do Pará

Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior
Universidade Federal do Pará

DEDICATÓRIA

Dedico em primeiro lugar ao meus pais, Alba Beckmann e Walter Carvalho, por estarem em mais uma etapa ao meu lado, me dando total apoio e incentivo. Aos familiares e amigos que sempre fizeram questão de acompanhar e trilhar o caminho comigo, sou muito grata por ter todos vocês junto comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por ter permitido e por ter me dado a grande oportunidade de realizar mais um sonho, por me abençoar com pais extremamente maravilhosos.

Agradeço os meus Pais, Alba Beckmann e Walter Carvalho e por total apoio, incentivo, palavras de carinho, força, foco e por serem fonte de toda minha gratidão e minha madrastra Vanda Ribeiro por me ensinar sempre a exercer a odontologia com amor. Agradeço meus familiares como avós, irmãos, tios e primos por terem me acompanhado neste sonho, pela força, palavras de animo e incentivo.

Agradeço meu orientador Professor Silvio Menezes, que depositou expectativas positivas e confiança no meu trabalho, contudo me fez amadurecer muito profissionalmente e chegar onde nunca pude almejar e imaginar que eu seria capaz.

Agradeço aos meus amigos de mestrado Mariana Balla, Erich Tanaka, Larissa Dias, Juliana Oliveira, Naama Alves, Raquel Miranda, Ricardo Fonseca, Andréia Araújo, Carlos Alberto, Camila Ribeiro, Márcio Ruffeil, Juliana Oliveira e a todos os mestrandos que estiveram conosco neste período, pois, a parceria e companheirismo nas tarefas diárias se tornaram muito mais tranquilas quando realizadas em equipe.

E por fim agradeço todos os professores da equipe do mestrado por todo conhecimento adquirido, foi fundamental para minha evolução profissional e pessoal, pois pretendo levar os melhores ensinamentos para a minha vida acadêmica .

EPIGRAFE

“Plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe mande flores. E você aprende que realmente pode suportar, que realmente é forte, e que pode ir muito longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!” (Shakespeare)

RESUMO

A *Lippia Thymoides* (LT) é usada na medicina ocidental popular para tratar cefaleias, inflamações dentárias, doenças periodontais e devido a sua ação antisséptica, anti-inflamatória, antibiótica, entre outras como relatada na literatura, o objetivo deste estudo é avaliar a composição química do óleo essencial de *Lippia Thymoides* e sua atividade antimicrobiana frente as cepas de *Prevotella Intermedia* (PI) que é uma das bactérias predominantes nas doenças periodontais. **Metodologia:** Óleos obtidos pelo processo de hidrodestilação foram identificados e testados através de um teste de Mínima concentração Inibitória (MIC) e teste de sensibilidade frente a bactéria PI. **Resultados:** O óleo essencial de LT exibiu uma atividade antibacteriana efetiva contra bactéria periodontopatogênica *Prevotella Intermedia* com um valor do (MIC) de 6,5 µg / ml e um teste de sensibilidade positivo. **Conclusão:** Os resultados encontrados em nossa pesquisa demonstram que o óleo da LT, dependente da Sazonalidade, são bastantes promissores, pois tem um grande potencial bacteriano e se torna um grande aliado para confecção de produtos que possam complementar o tratamento das doenças periodontais.

Palavras chaves: Antimicrobial activity; essential oils; *Prevotella intermedia*

ABSTRACT

Lippia Thymoides (LT) is used in Western medicine to treat respiratory infections, periodontal diseases and periodontal diseases, anti-inflammatory, antibiotic, among others that are related in the literature, the objective of this study is to evaluate the chemical composition of essential oil of Lippia Thymoides and its antimicrobial activity against *Prevotella Intermedia* (PI) strains and the prevalence of the diagnosis of periodontal diseases. **Methodology:** the hydrodistillation process was identified and tested through a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) test and resistance test against a bacterium. **Results:** The essential oil of an anti-inflammatory diet relative to pre-medial periodontopathogenic interactions is 6.5 µg / ml and a positive capacity test. **Conclusion:** the results found in our research demonstrated that the oil of LT, dependent on seasonality, are promising, are a great bacterial potential and becomes a great ally for the manufacture of products that complement the treatment of periodontal diseases

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	10
2.OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3. MATERIAIS E METODOS	13
4. RESULTADOS	17
5. DISCUSSÃO	20
6. CONCLUSÃO	23
7. REFERÊNCIA	24

1. INTRODUÇÃO

Na cavidade oral existem inúmeras espécies diferentes de microorganismos, que juntas participam da homeostase do meio, sendo assim, podem se localizar em diversas superfícies orais formando assim o biofilme dental. Com acúmulo do biofilme, se não removido no tempo ideal, também ocorre uma deposição de outros microorganismos, que através de uma interação com os tecidos periodontais formam assim o processo inflamatório, podendo acarretar alguns tipos de doenças periodontais específicas (ZOGHBI, 2002; MUNCHOW, 2015)

O processo inflamatório é formado por várias bactérias anaeróbicas gram negativas e uma delas se destaca por ser considerada um dos principais agentes etiológicos das doenças periodontais, conhecida como *Prevotella intermedia* que de acordo com Socransky 1998 pertence ao complexo Laranja. Um dos seus principais habitats é o biofilme subgingival, pois, com o seu acúmulo e crescimento, obtém-se um ambiente favorável e anaeróbico para seu desenvolvimento, sendo bastante sensível ao oxigênio, podendo induzir mudanças no padrão genético e na expressão proteica da bactéria. PFALLER, (2010); MUNCHOW(2015)

Por meio dos seus fatores de virulência e patogenicidade, ela pode atacar diretamente os tecidos periodontais ou ainda pela liberação de metabólitos biologicamente ativos a partir das células dos tecidos do hospedeiro como a produção de enzimas protetoras, presença de proteases que intensificam a doença periodontal, além de possuir uma cápsula polissacarídica que a protege da fagocitose, podendo causar reabsorção óssea e ativar ou inibir células imunitárias KLINKE (2002); MUNCHOW (2015)

Com base na terapêutica, além da higiene oral e motivação, pode ser realizado um tratamento padrão para periodontite, a qual, consiste na raspagem e alisamento radicular para obter-se uma redução da atividade microbiana. Em casos mais graves, essa opção de tratamento torna-se inviável, pois, certos patógenos localizados em regiões de difícil acesso ou em áreas de bifurcação, os instrumentais não conseguem realizar o devido controle, tendo que ser associados a medicação antibiótica e ao uso de colutórios, que de acordo com a literatura quando associados promovem resultados clínicos superiores e persistentes SOCRANSKY (1998); P. Garcia-Palencia (2016):

O uso de colutórios a base de dicluonato de clorexidina a 0,12% tem se demonstrado efetivos para reduzir a placa bacteriana em gengivites, por outro lado existem efeitos colaterais localizados e reversíveis, principalmente a mancha marrom dos dentes, da língua, e das restaurações de silicato de resina, além da deficiência transitória de percepção do paladar. Sendo assim, devido os seus efeitos colaterais, alguns pacientes buscam por meios que

possam ser mais simples e que possam ajudar no tratamento diminuindo tanto a doença, quanto os custos. Esses meios, possibilitam o uso de plantas medicinais com potenciais e fins terapêuticos. COWAN (1999); Garcia-Palencia (2016)

A *Lippia Thymoides* também conhecida como alecrim do mato ou alecrim do campo apresenta-se como um arbusto da Amazônia, em especial em Abaetetuba-Pará, com um potencial em vários tratamentos da medicina tradicional e seus óleos e extratos possuem um grande efeito anti-inflamatória, antisséptico e cicatrizante. O que faz com que o estudo da *Lippia Thymoides* frente a bactérias periodontopatogênicas como a *Prevotella Intermedia*, seja um substituto natural para o tratamento das doenças periodontais com menos efeitos adversos. (BURT, 2004); (ADRIAENS, 2004) (GOMES 2011) (STEFKA 2017)

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais:

Quantificação dos constituintes químicos e avaliação da atividade antimicrobiana do extrato de *Lippia Thymoides*, frente a cepa de *Prevotella Intermédia*

2.2 Objetivos específicos

- Obtenção do óleo
- Caracterização do óleo
- Identificação dos constituintes químicos
- Quantificação dos constituintes químicos
- Avaliação da atividade antimicrobiana
- Obtenção dos valores de concentração inibitória mínima;

3. MATERIAIS E METODOS

3.1 Matriz vegetal

As primeiras mudas de *L. thymoides* (Fig. 1) foram doadas por uma herveira de Abaetetuba, e cultivadas na zona rural do mesmo município, cujas coordenadas geográficas 1°46'15.9" de latitude Sul e 48°47' 02.2" de longitude Oeste. Um exemplar da espécie foi registrado, identificado e incorporado no Herbário “João Murça Pires” do Museu Paraense Emílio Goeldi, em Belém, Pará, sob o número MG 213373.

Figura 01 - Fotografia de *Lippiathymoide*



3.2 Determinação da umidade

A determinação da umidade residual dos materiais botânicos trabalhados foram realizadas em balança determinadora de umidade da Marte®, modelo ID 50, com infravermelho, no momento das extrações.

3.3 Obtenção do óleo essencial por hidrodestilação

O material botânico (parte área) foicollido manualmente às 6 horas da manhã, transportado de imediato para o laboratório, em seguida colocado sobre bandejas, em estufa (34 °C), com ventilação, para secagem durante três dias, após isso triturado em processador.

A extração do óleo essencial das folhas secas de *L. Thymoides* foi realizada por hidrodestilação (HD), utilizando sistema de vidro do tipo Clevenger modificado acoplado a

sistema de refrigeração para manutenção da água de condensação entre 10-15° C, durante 3 h. Os óleos, após extração foram centrifugados durante 5 min a 3000 rpm, desidratados com Na₂SO₄ anidro e novamente centrifugados nas mesmas condições. Os óleos foram armazenados em ampolas de vidro âmbar, vedadas com chama e, acondicionados em ambiente refrigerado a 5°C.

3.4 Cálculo do Rendimento do óleo essencial extraído por Hidrodestilação

O rendimento mássico(%) do óleo essencial foi realizada em base seca de acordo com a equação 4:

$$T = \frac{v_{\text{óleo}}}{m_{\text{amostra}} \times \left(\frac{100 - U}{100} \right)}$$

Onde:

T é o teor do óleo essencial, em %;

V_{óleo} é o volume de óleo extraído, em mL;

m_{amostra} é a massa vegetal bruta, em g;

U é o teor de umidade presente na massa vegetal bruta, em %.

3.5 Identificação dos constituintes químicos

A composição química dos óleos essenciais foi analisada por Cromatografia de Fase Gasosa/Espectrometria de Massas no equipamento Shimadzu QP 2010 plus, auto-injetor: AOC-20i equipado com coluna capilar de sílica Rtx-5MS (30m x 0,25 mm; 0,25 mm de espessura do filme) nas seguintes condições operacionais: programa de temperatura: 60°-240°C, com gradiente de 3°C/min); temperatura do injetor: 250°C; gás de arraste: hélio (velocidade linear de 32 cm/s, medida a 100°C); injeção sem divisão de fluxo (0,1 mL de uma sol. 2:1000 de *n*-hexano); temperatura da fonte de íons e outras partes 200°C. O filtro de quadrupolo foi utilizado para varredura na faixa de 39 a 500 daltons a cada segundo. A ionização foi obtida pela técnica de impacto eletrônico a 70 eV.

A identificação dos componentes voláteis foi baseada no índice de retenção linear (IR) calculado em relação aos tempos de retenção de uma série homóloga de *n*-alcanos e no padrão de fragmentação observados nos espectros de massas, por comparação destes com amostras autênticas existentes nas bibliotecas do sistema de dados e da literatura⁴.

4. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

4.1. Microrganismo

Nos ensaios microbiológicos foi utilizada uma cepa de microrganismos padrão de *Prevotella intermédia* ATCC 49046 adquirido da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e pertencente ao banco de padrões do Laboratório de Controle de qualidade microbiológico de medicamentos do Centro Universitário do Pará-CESUPA.

O inóculo foi obtido a partir de uma suspensão bacteriana de uma cultura recente (máximo 48h a 72h) em solução salina 0,85% (m/V). A concentração do microrganismo foi padronizada pela comparação turbidez do inóculo com a escala *MacFarland* equivale a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (NCCLI M7-A7, 2006) em turbidímetro (equipamento).

4.1.2 Controle positivo e negativo

O antibiótico vancomicina (sigma - Aldrich[®]) foi usado como controle positivo na concentração de 16 µg/mL; como controles negativos foram adotadas a cultura do microrganismo avaliado e o meio estéril.

Os meios de culturas que foram utilizados para a análise foram o ágar(BHI) e o caldo cérebro e coração respectivamente, contendo polissorbatato 80 à 0.5% (m/V) e sangue de carneiro desfibrinado, para o teste de CIM.

4.2 Avaliação da Sensibilidade da amostra pelo método de difusão em Agar

Para preparar as placas foram vertidos 11 mL do Agar BHI em placas de 15x100 mm. Sobre essa camada de meio solidificada foram adicionados 10 mL do Agar BHI-inóculo contendo 10^6 UFC/mL¹¹

Com as duas camadas de meio uniformemente sobrepostas e já solidificadas, foram adicionados papel de filtro com diâmetros de aproximadamente 6 e 8 mm (F. Bras, 2010) impregnados com 10 µL de óleo. As amostras foram colocadas sobre a cultura e incubadas à 35°C/24h em ambiente de anaerobiose¹¹. A análise foi realizada em triplicata.

Após o período de incubação as placas foram reveladas com cloreto de trifeniltetrazólio à 7 mg/mL em ágar bacteriológico à 1% (m/V).

Os resultados dos halos (mm) foram mensurados com auxílio de um paquímetro e avaliados por meio de análise descritiva, frente aos valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação.

4.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM), pelo método de diluição em caldo

A CIM do óleo essencial foi realizada segundo a metodologia adaptada da microdiluição proposta por NCCLI M7-A7(2006). O teste foi realizado em tubos *eppendorfs*®, onde uma alíquota de 50 µL do óleo foi diluída na proporção 1:2 em caldo BHI com sangue desfibrinado á 5% (V/V) e polisorbato 80, contendo 10⁵ UFC/mL até 20 diluições. Em seguida, as culturas foram incubado à 35°C/24h em ambiente de anaerobiose. O teste foi realizado em triplicata.

Após o período de incubação as placas foram reveladas pelo semeio de 40 µL da cultura de cada diluição em placas de *petri* (5x50 mm) contendo ágar caseína soja com sangue desfibrinado a 5% (V/V) e incubados por mais 24h/35°C. As placas foram avaliadas pela presença ou ausência de crescimento, quando comparadas aos grupos controle negativo e positivo. A CIM foi revelada na última diluição onde não houve crescimento microbiano.

4. RESULTADOS

Na identificação dos constituintes químicos analisada por cromatografia de Fase Gasosa/Espectrometria de Massas, podemos observar que obtivemos o Timol em maior concentração (59,91) e outros constituintes porém, com menor relevância quando comparados com o thymol. O rendimento do óleo de *L. thymoides* obtido por hidrodestilação foi de 0,7 %. A composição química foi determinada por CG-EM, onde foram identificados trinta e cinco constituintes voláteis, representando 96,7 % do total de compostos presentes no óleo. Os constituintes principais encontrados no óleo essencial foi o timol (59,91 %), γ -terpineno (8.16 %), *p*-cimeno (7,29 %), acetato de timol (6,26 %) e β -cariofileno (4,49 %) (Tabela 1)

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial de *Lippia thymoides*

RI	Constituents	%
924	α -thujene	0.74
932	α -pinene	0.20
974	β -pinene	0.09
988	Myrcene	2.06
1002	α -phellandrene	0.23
1008	δ -3-carene	0.12
1014	α -terpinene	1.58
1020	<i>p</i>-cymene	7.29
1044	(E)- β -ocimene	0.14
1054	γ-terpinene	8.16
1086	Terpinolene	0.30
1095	Linalool	0.13
1141	Camphor	0.04
1167	Umbellulone	0.21
1174	terpinen-4-ol	0.34
1232	Methylthymol	1.43
1289	Thymol	59.91

1349	thymol acetate	6.26
1374	α – copaene	0.02
1403	methyl eugenol	0.05
1417	β-caryophyllene	4.49
1430	β -copaene	0.11
1432	trans- α -bergamotene	0.14
1434	γ -elemene	0.14
1452	α - humulene	0.75
1458	allo-aromadendrene	0.06
1478	γ -muurolene	0.24
1484	germacrene D	0.26
1495	γ -amorphene	0.18
1511	δ -amorphene	0.16
1502	trans- β -guaiaene	0.05
1513	γ -cadinene	0.20
1522	δ -cadinene	0.42
1548	Elemol	0.04
1582	caryophyllene oxide	0.12
Total		96.7

IR = Índice de Retenção

Já na avaliação da atividade antimicrobiana do óleo frente as cepa de *Prevotella intermédia* foi realizada pelo método de microdiluição que baseia-se em sucessivas diluições da amostra em meio de cultura contendo sangue. A presença de sangue e de tensoativo no meio impossibilitou o uso de corante, por isso, os resultados das culturas foram revelado por meio de plaqueamento e conseqüente determinação da ação bacteriostática. Os resultados revelaram que o óleo de *L. thymoides* foi efetivo em baixas concentrações frente a bactéria anaeróbica *Prevotella intermedia* com a concentração Inibitória Mínima de 6,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, como mostra a Tabela 1. Foram utilizadas um controle positivo contendo antibiótico (Vancomicina)

e dois controles negativos um com o meio estéril, na qual não obteve diferença entre o FN e PI, e outro de meio com microorganismos, na qual, teve um cultivo das bactérias.

AMOSTRAS	<i>P. intermedia</i>	Padrão (Vancomicina)
Halo (mm)	19	0,16 ug/mL
CIM ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	6,5	28mm
¹ VCM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	28	

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) e halo de inibição do óleo essencial de *L. thymoides*



Figura 1: Controle positivo

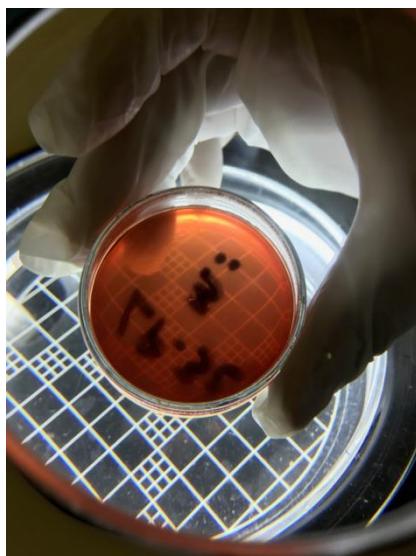


Figura 2: MIC

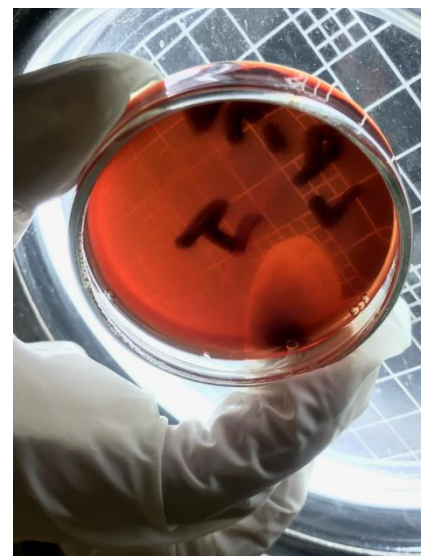


Figura 3: Crescimento Bacteriano

5. DISCUSSÃO

O uso de plantas medicinais pela população, como uma terapia alternativa para tratar muitas doenças, tem sido uma prática comum desde milhares de anos atrás. Atualmente, F. S. Silva et al. 2015 afirma que a descoberta de várias plantas vem sendo utilizadas como um recurso bastante promissor para novos agentes bactericidas, contra diversas infecções e patologias, onde os óleos essenciais extraídos tem demonstrado um grande potencial servindo de base para diversas aplicações terapêuticas corroborando com estudos realizados pelos autores Dutra 2016 e Stefka Koychev 2017.

A procura por novos agentes bactericidas específicos contra os microorganismos das doenças periodontais é alta, sendo assim, várias plantas medicinais estão sendo estudadas como *Lippia* Origanoides, própolis, Chicória como relatado por Diaz Suyo JA 2011, Signoretto 2011 e Sarrazin 2015 a fim de tentar reduzir efeitos colaterais causados pelos métodos já utilizados como forma de tratamento, que por outro lado, F. S. Silva et al. 2015 afirma não possuem constituintes capazes de exercer atividades antimicrobianas, antioxidantes, analgésicas, anti- inflamatória, Vasorelaxante como a *Lippia* Thymoide.

Lippia thymoides é umas das espécies do gênero *Lippia* pouco explorada, sendo assim, em uma busca realizada na literatura, (F. S. Silva et al. 2015) observou que mesmo pela variedade do gênero *Lippia*, que são mais de 200 espécies, sua abundância nos óleos essenciais e por possui uma grande variação em sua composição química, a planta tornou-se de grande interesse econômico, sendo testadas e efetivas contra bactérias gram positivas como *S. aureus* e *M. luteus* não correlacionando a nenhum estudo recente com bactérias gram negativas como a *P. Intermédia* (OLIVEIRA, 2007 e JUIZ, 2015)

Os primeiros relatos na literatura reportam metil timol como constituinte principal identificado no OE de um espécime de *L. thymoides*, cujo local de coleta não foi informado (VELASCO-NEGUERUELA et al., 1993; TERBLANCHÉ & KOENELIUS, 1996; PASCUAL et al., 2001); o óleo de um outro espécime de *L. thymoides* coletado em Olindina, estado da Bahia, sem informação dos percentuais, cujo o componente principal foi β -cariofileno, seguido de α -humuleno, γ -elemeno, γ -cadineno e metil timol (CRAVEIRO et al., 1981). Zoghbi & Andrade (2014), analisaram o óleo essencial das partes aéreas de um espécime de *L. thymoides* comercializado na feira do Ver-o-peso em Belém do Pará, cujo o constituinte majoritário foi timol (62,67%). O estudo sazonal de um outro espécime de *L. thymoides*, coletado em Feira de Santana, Bahia, apresentou como componente majoritário β -cariofileno (17,22–26,27%), sem variações significativas dos constituintes químicos durante o período de estudo nas quatro estações do ano (SILVA et al., 2015).

Em testes Microbiológicos, (Arbia, L. 2017) em seu estudo, verificou que a *prevotella Intemedia* mostrou-se sensível a extratos de plantas diferenciadas, nativas do sul da Argélia

como: Herba-alba (0,251 µg / ml); Opuntia ficus-indica (0,03 µg / ml), Camellia sinensis (2,09 µg / ml) and Phlomis crinita (590, 82 µg / ml) corroborando aos resultados de nossa pesquisa, no qual, a mesma bactéria mostrou-se sensível, porém, em uma concentração inibitória mínima de 6,5 µg / ml, o que nos leva a entender que mesmo sendo uma bactéria anaeróbica, existe na literatura vários estudos mostrando sensibilidade a diversas plantas, porém, nenhuma delas correlacionando a PI com o óleo de LT sendo uma planta nativa da região norte.

Quando avaliamos as terapias adequadas para o tratamento das doenças periodontais, há um envolvimento de terapias mecânicas, antimicrobianas envolvendo medicações sistêmicas e uso de colutórios específicos, sendo assim, Serrano 2015 afirma que o controle de placa com a limpeza mecânica não é suficiente para regular ou evitar o aparecimento ou a recorrência das doenças periodontais, portanto, Dahlen 2017 corrobora afirmando que métodos químicos de remoção do biofilme microbiano, como antimicrobianos, enxaguatórios bucais foram recomendados para uso como adjuvante ou, em algumas situações limitadas, como substituto da remoção mecânica do biofilme microbiano.

No tratamento mecânico associado ao tratamento sistêmico, Kestra 2014, afirma em sua meta-análise que os antibióticos sistêmicos combinados como o metronidazol e amoxicilina com a terapia periodontal não cirúrgica tiveram um efeito adicional significativo no tratamento de pacientes com periodontites agressiva corroborando com G. Dahlen 2017 que concluiu que o uso de metronidazol adjunto a terapia mecânica não tiveram bactérias orais resistentes a antibióticos em um acompanhamento de 5 anos após a terapia, porém, é necessário que o paciente tenha um nível alto de higiene bucal, o que faz com o tratamento possa ser alterado por depender do máximo cuidado do paciente, sendo que, o mais importante preditor de doenças periodontais, independentemente da idade, é a pobre higiene oral.

Outra terapia que é também muito utilizada nos tratamentos das doenças periodontais é o tratamento mecânico com o uso de colutórios como a Clorexidina 0,12%. Estudos como os de Falagas, 2000 revelaram que o uso de enxaguante bucal contendo clorexidina, além da escovação e limpeza por 4, 6 semanas ou 6 meses, leva à uma grande redução no acúmulo de placa bacteriana ,portanto, James P, 2017 afirma que a lavagem por 4 semanas ou mais causa manchas nos dentes, incluindo acúmulo de cálculo (tártaro) e alteração temporária do paladar, o que conclui-se que ainda nos deparamos com alguns efeitos adversos no uso da clorexidina.

Quando correlacionamos o efeito no uso da clorexidina e o efeito do Thymol que foi o componente majoritário da *Lippia Thymoides*, Karpinski 2015 acredita-se que a clorexidina, por ser um produto insolúvel e um base forte, problemas podem ser encontrados ao se administrar clorexidina como um gel ou um creme dental, pois a clorexidina pode se ligar aos ingredientes dos produtos, reduzindo sua atividade o que dificulta o seu uso em outros tipos de produtos, além dos seus efeitos colaterais (Eley, 1999), diferentemente ao uso de Thymol que por ser uma produto natural Vlachojannis 2016, afirma ser um constituinte já adicionado em produtos atualmente comercializado no mercado como o listerine, sendo assim, uma alternativa complementar nos tratamentos já utilizados para as doenças Periodontais com menores índices de efeitos.

Quanto a toxicidade do Thymol (Vlachojannis, 2016) afirma que quando adicionados valores acima de 4,3mL a citotóxicidade pode ser esperada. Em contrapartida, (La chapa, 2018) afirma que o Tymol possui propriedades antimicrobianas e pode ser incluído como enxaguante bucal, sendo considerados produtos naturais pouco tóxicos ou não tóxicos (Jorge J. 2018), sendo assim, por ser uma planta já administrada em forma de chá na região Norte como em Abaetetuba, acredita-se que estudos mais aprofundados possam ser realizados com objetivo de avaliar a toxicidade ideal e sua eficácia dentro de um produto, sendo ele um medicamento, creme dental, com intuito de ser um produto auxiliar nas doenças periodontais com menores índices de efeitos adversos.

6. CONCLUSÃO

Desta forma, os resultados encontrados em nossa pesquisa demonstram que o óleo da LT (caule e folha), dependendo da Sazonalidade, tem um grande potencial bacteriano o que faz com que estudos mais aprofundados sejam relevantes para avaliar a citotoxicidade do extrato, afim de futuramente, poder ser uma possibilidade de tratamento para doenças periodontais, incorporada em formulações farmacêuticas de uso bucal, sendo um enxaguante bucal, medicações bucais, entre outros.

7. REFERÊNCIA

1. ZOGHBI, M. G. B. et al. **Volatile constituents of lippialupulinacham. Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, p. 29-31, 2002.
2. MUNCHOW, E. A. et al. **Prevotella Intermedia: uma breve revisão.** Braz J Periodontol, v. 25, n. 01, mar. 2015.
3. Pfaller MA, Diekema DJ. **Epidemiology of invasive in north america.** Crit. Rev Microbiol 2010; 36(1):1-53
4. KLINKE TH, Klimm W. **Induction of caries-like lesions by cândida albicans in na artificial mouth.** Caries Research. v. 36, n. 3, p. 195-196, 2002.
5. Socransky SS, Haffajee AD et al. **Microbial Complexes in sub gingival Plaque.** J. Clin Periodontal 1998
6. OLIVEIRA RAG, Lima EO, Vieira WL, Freire KRL, Trajano VN, Lima IO, Souza EL, Toledo MS, Silva-Filho RN. **Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica.**2007. Rev Bras Farmacogn 16: 77-82
7. COWAN, MM 1999; **Plant Products as antimicrobial agents;** Clin Microbiol Rev 12, 564-582
8. ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry.** 4. ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007.
9. BURT, S. 2004 **Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods.** A review. Int J food microbial 94, 223-253
10. Adriaens & Adriaens. **Effects of nonsurgical periodontal therapy on hard and soft tissues;** Periodontol 2000. 2004.

11. RENVERT S. et al. **Histological and microbiological aspects of ligature-induced periodontitis in Beagle dogs.** Journal of Clinical Periodontology, n.23, p.310-319, 1996.
12. FERES, M. et al. **In vitro antimicrobial activity of plant extracts and propolis in saliva sample of healthy and periodontally-involved subjects.** J. Int. Acad. Periodontol., Londres, v. 7, n. 5, p. 90-97, Nov. 2005
13. ALMEIDA, M. Z. DE. **Plantas medicinais.** 3. ed. - Salvador : EDUFBA, 2011.
14. SOARES & TAVARES-DIAS. **Espécies de Lippia (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura.** Biota Amazônia, v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.
15. GOMES, S. V. F; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V.R.S. **Aspectos químicos e biológicos do gênero lippia enfatizando lippigracilisschauer.** Eclética Química, São Paulo, v.36, n. 1, 2011.
16. JUDD W. S. **Plant Systematics: A phylogenetic approach, Sunderland.** 2 . ed. UK, Sauer, 2002.
17. SILVA, FS et al; **Chemical composition and pharmacological properties of the essential oils obtained seasonally from lippie thymoides.** Pharm Biol, Early Online; 2015; 1-10; ISSN 1388-0209print/ISSN 1744-5116 onlineEditor-in-Chief:John M. Pezzuto.
18. NCCLS. NCCLS document M7-A7 – **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow Aerobically;** 7^a ed. Wayne (Pennsylvania): NCCLS; 2006.
19. James P, Worthington HV, Parnell C, Harding M, Lamont T, Cheung A, Whelton H, Riley P ; **Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health (Review);** Cochrane Database of Systematic Reviews; 2017

20. Stefka Koychev,* Henrik Dommisch,* Hong Chen,*† Nicole Pischon*; **Antimicrobial Effects of Mastic Extract Against Oral and Periodontal Pathogens**; Journal of Periodontology; 2017
21. OLIVEIRA RAG, Lima EO, Vieira WL, Freire KRL, Trajano VN, Lima IO, Souza EL, Toledo MS, Silva-Filho RN 2007. **Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica**. Rev Bras Farmacogn 16: 77-82.
22. JUIZ, P JL; LUCCHESI, AM; GAMBARI, R et. Al; **Essential oils and isolated compounds from Lippia alba leaves and flowers: Antimicrobial activity and osteoclast apoptosis**. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE 35: 211-217, 2015
23. Caton JG; Armitage G; **A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification**; *J Periodontol*. 2018;89(Suppl 1):S1–S8.
24. Bueno J, Escobar P, Martínez JR, et al. (2011). **Composition of three essential oils, and their mammalian cell toxicity and antimycobacterial activity against drug resistant-tuberculosis and nontuberculous mycobacteria strains**. Nat Prod Commun 6:1743–8.
25. C. VLACHOJANNIS ET AL. **Listerine® Products: An Update on the Efficacy and Safety**; *Phytother. Res.* 30: 367–373 (2016)
26. Jorge J. De La Chapa, et al. **Thymol Inhibits Oral Squamous Cell Carcinoma Growth via Mitochondria-Mediated Apoptosis**, 2018
27. KLINKE TH, Klimm W. **Induction of caries-like lesions by *Candida albicans* in an artificial mouth**. *Caries Research*. v. 36, n. 3, p. 195-196, 2002.
28. VELASCO-NEGUERUELA, A. et al. Volatile constituents of four Lippia species from Córdoba (Argentina). **Journal Essential Oil Research**, 5, 513-524, 1993.

29. LIMA, G. P. G. et al. **Further insecticidal activities of essential oils from lippiasidoides and croton species against aedesaegyptil.** Parasitology Research, doi10.1007/s00436-013-3351-1, 2013.
30. A Sharifzadeh, A R KHOSRAVI; **Potential Effect of 2-isopropyl-5-methylphenol (Thymol) alone and combination with fluconazole against clinical isolates of candida albicans, C. Globrata and C. Krusei;** Journal de Mycologie Médicale 2018.
31. Arbia L, Chikhi-Chorfi N, Betatache I et al; **Antimicrobial activity of aqueous extracts from four plants on bacterial isolates from periodontitis patients;**2017
32. Rafael C. Dutra Maria M. Campos Adair R.S. Santos João B. Calixto; **Medicinal plants in Brazil.**Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives; Pharmacological Research; 2016
33. P. Garcia-Palencia, MA. De La Garza- Ramos ET AL; **Antimicrobial Effect of the Methanolic Extract Psacalium decompositum on Periodontopathogenic Bacteria;** International Journal of Pharmacology; 2016
34. Díaz-Suyo JA, Proaño-de Casalino D. **Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa-Perú, sobre cepas de Porphyromonas gingivalis y Fusobacterium nucleatum.** Rev Estomatol Herediana. 2011; 21(3):125-13
35. Sandra Layse F. Sarrazin, et al. **Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from Lippia organoides.** Lipids in Health and Disease (2015) 14:145
36. Caterina Signoretto et al. **Effects of Mushroom and Chicory Extracts on the Physiology and Shape of Prevotella intermedia, a Periodontopathogenic Bacterium.** Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2011, Article ID 635348, 8 pages doi:10.1155/2011/635348

37. G. Dahlen, H.R. Preus; **Low antibiotic resistance among anaerobic Gram-negative bacteria in periodontitis 5 years following metronidazole therapy.** Research paper Antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria; *Anaerobe* 43 (2017) 94e98
38. Karpinski TM, Szkaradkiewicz AK. **Chlorhexidine - pharmaco-biological activity and application.** *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2015;19(7): 1321–6.
39. Eley BM. **Antibacterial agents in the control of supragingival plaque - a review.** *British Dental Journal* 1999;186(6): 286–96.
40. CRAVEIRO A.A. et al. **Óleos essenciais de Plantas do Nordeste.** Fortaleza: Editora UFC, 1981.
41. ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A. **Composição química dos óleos essenciais de plantas aromáticas comercializadas no Ver-o-Peso.** In: ZOGHBI, M.G.B.; MOTA, M.G.C.; CONCEIÇÃO, C.C.C (orgs). – Belém: UFRA/MPEG, 2014. Cap. 12, p. 253-300.
42. TERBLANCHÉ, F.C.; KOENELIUS, G. Essential constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae) – A literatura review. **Journal Essential Oil Research**, v.8, p. 471-185, 1996.
43. SILVA, F.S. et al. Chemical composition and pharmacological properties of the essential oils obtained seasonally from *Lippia thymoides*. **Pharmaceutical Biology**, p. 1-10, 2015
44. PASCUAL, M.E. et al. *Lippia*: tradicional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, p. 201-214, 2001.