

CENTRO UNIVERSITÁRIO DO ESTADO DO PARÁ
ÁREA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM ODONTOLOGIA

ERICH BRITO TANAKA

Caracterização e Análise do Potencial Antimicrobiano do Óleo Essencial da *Lippia thymoides* frente a *Fusobactérium nucleatum*

Belém

2018

CENTRO UNIVERSITÁRIO DO ESTADO DO PARÁ
ÁREA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM ODONTOLOGIA

ERICH BRITO TANAKA

**Caracterização e Análise do Potencial Antimicrobiano do Óleo Essencial da *Lippia*
thymoides frente a *Fusobactérium nucleatum***

Dissertação apresentada para obtenção de grau de mestre
em Odontologia do Programa de Mestrado
Profissionalizante em Clínica Odontológica do Centro
Universitário do Pará - CESUPA

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Maria de Souza Rodrigues

Belém

2018

CENTRO UNIVERSITÁRIO DO PARÁ

ERICH BRITO TANAKA

**ANÁLISE DOS CONTITUENTES QUÍMICOS E DO POTENCIAL
ANTIMICROBIANO DO EXTRATO DA LIPPIA THYMOIDE FRENTE A
FUSOBACTÉRIUM NUCLEATUM**

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CLÍNICA ODONTOLÓGICA**

Data da defesa: 06 /12/2018

Conceito:

Banca examinadora:

Prof. Dr^a. Tânia Maria de Souza Rodrigues (Orientadora)
Centro Universitário do Pará

Prof. Dr. Fabricio Mesquita Tuji
Centro Universitário do Pará

Prof. Dr. Mauro André Damasceno de Melo
Instituto Federal do Pará

Dedicatória

Dedico aos meus pais Akihito e Marilúcia e a minha esposa Luciana eternos incentivadores os quais me deram total apoio e suporte para que me concentrasse no objetivo de concluir essa etapa. Dedico também aos meus filhos Théo e Maitê, razões da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro Universitário do Pará;

A Prof. Dr^a. Tânia Maria de Souza Rodrigues pela orientação na elaboração deste trabalho;

Ao Prof Dr.Silvio Augusto Fernandes de Menezes pela coorientação deste trabalho;

A minha colega de mestrado Tabata Resque Beckmann Carvalho e todos os outros colegas e professores que me acompanharam nesta jornada;

Se você já rendeu sua fé a Deus, e a vida continua lhe impondo obstáculos, use a graça divina e diga: “Se for sua vontade que eu realize este sonho, me ajude”. Acredito que o caminho de Deus é o único que nos leva a realizar este potencial. Meu conselho é saber tudo o que for possível e render o resultado para o conhecimento dele. Com o tempo, o quebra-cabeça se resolverá. Como diz a Bíblia, “Sua sabedoria é profunda, seu poder é imenso” (Jó 9:4 – NVI).

RESUMO

Este estudo objetivou descobrir os componentes químicos e fazer uma análise da atividade antimicrobiana do óleo essencial da *Lippia Thymoide* sobre a cepa da *Fusobactérium Nucleatum* (FN). Valendo-se da informação de que esta bactéria é anaeróbica e altamente patogênica para a cavidade bucal, a obtenção do óleo essencial se deu pelo método da hidrodestilação e sua composição química foi descoberta usando a cromatografia de gás-líquido acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). As respostas ao teste de sensibilidade (15 mm) e da concentração inibitória mínima (1,6 µg/ml), comparando com o teste controle usando o antibiótico Vancomicina de sensibilidade (34mm) e CIM (0,16 µg/ml), demonstraram seu alto potencial antimicrobiano frente FN e uma possível arma ao combate das graves doenças periodontais causadas por ela.

Palavras chaves: Atividade antimicrobiana. Óleo essencial. *Fusobactérium Nucleatum*. *Lippia Thymoide*.

ABSTRACT

This study aimed to discover the chemical components and to analyze the antimicrobial activity of *Lippia Thymoide* essential oil on the *Fusobacterium Nucleatum* (FN) strain. Based on the information that this anaerobic bacterium is highly pathogenic to the oral cavity, the essential oil was obtained by the hydrodistillation method and its chemical composition was discovered using gas-liquid chromatography coupled to mass spectrometry (GC- MS). Responses to the sensitivity test (15 mm) and the minimum inhibitory concentration (1.6 µg / ml), compared to the control test using the antibiotic Vancomycin sensitivity (34 mm) and MIC (0.16 µg / ml) its high antimicrobial potential against FN and a possible weapon to combat serious periodontal diseases.

Key words: Antimicrobial activity. Essential oil. *Fusobacterium Nucleatum*. *Lippia Thymoide*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	P.
2. OBJETIVOS	P.
2.1 OBJETIVOS GERAIS	P.
2.1.2 Objetivos Específicos	P.
3. MATERIAIS E METODOS	P.
3.1 MATRIZ VEGETAL	P.
3.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL POR HIDRODESTILAÇÃO.....	P.
3.3 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE	P.
3.4 CALCULO DE RENDIMENTO DO ÓLEO	P.
3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS	P.
4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	P.
4.1 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>INVITRO</i>	P.
4.2 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA AMOSTRA PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR	P.
4.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM CALDO	P.
5. RESULTADOS	P.
6. DISCUSSÃO	P.
7. CONCLUSÃO	P.
8. REFERÊNCIA	

1 INTRODUÇÃO

As doenças periodontais são infecções que levam a destruição dos tecidos de suporte dos dentes, causadas por um complexo extenso de bactérias que quando instaladas liberam mediadores químicos fazendo com que haja a permanência do processo inflamatório. A fase inicial da doença se apresenta pela presença do biofilme bacteriano que toma conta de todo o periodonto (DUNCAN, 2007).

Uma das bactérias mais estudada dessa enorme organização do biofilme é a *Fusobacterium nucleatum*, componente estrutural chave da placa dental normal e associada a doença. As *fusobactérias* são notáveis por suas interações específicas com diversas espécies de bactérias orais, sendo identificadas como organismos de coagregação, o que tem levado o interesse sobre o papel do organismo como patógeno oportunista e suas proteínas de superfície que podem estar envolvidas na aderência e coagregação com outras bactérias (DUNCAN, 2007).

Diante deste problema, o controle de placa microbiana é uma maneira eficaz de tratar e prevenir as doenças Periodontais. Esse controle pode ser mecânico com raspagem e alisamento radicular sub-gengival, mais também pode-se ter o auxílio de inibidores químicos de Biofilme e de cálculo, incorporado aos dentifrícios e enxaguatórios bucais

Neste contexto, é válida a investigação de meios terapêuticos alternativos com comprovada evidências *in vitro* da atividade antimicrobiana, as quais poderão ser aplicadas na prevenção e tratamento das infecções microbianas com eficácia, custos baixos e menores efeitos colaterais.

A região amazônica com sua enorme biodiversidade e potencial de sustentabilidade tem na produção de medicamentos alternativas para o combate da doença periodontal.

A flora da Amazônia apresenta-se como uma fonte renovável, apropriada à produção de essências aromáticas e com reais perspectivas de geração de riqueza. Neste sentido é preciso estender o conhecimento técnico-científico das espécies com potencial medicinal, visando subsidiar o setor empresarial na concepção de projetos tecnológicos voltados à agroindústria regional.

Muitas ferramentas foram desenvolvidas ao longo de centenas de anos de pesquisa em produtos naturais visando a escolha adequada da fonte de possíveis novas moléculas. Dentre elas, a quimiosistemática e a etnofarmacologia destacam-se como possíveis instrumentos para escolha bem-sucedida de espécies candidatas a fornecedoras de novas moléculas.

A quimiosistemática permite que se faça uma escolha racional da espécie, com base em informações químicas já obtidas de uma família, tribo ou gênero. Presume-se que uma dada classe química esteja presente em espécies relacionadas taxonomicamente, aumentando, assim, a probabilidade de encontrar substâncias de interesse, facilitando a escolha da espécie.

Óleos essenciais produzidos na região poderão servir como matéria prima à indústria da química fina, sejam por sua aplicação direta em produtos como perfumes, fragrâncias, antioxidantes naturais e cosméticos, seja por sua transformação em produtos com aproveitamento nas indústrias de fito-medicamentos.

O óleo produzido através do gênero *Lippia* (Verbenácea), possui cerca de 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores, cujos maiores centros de dispersão se encontram em países das Américas do Sul e Central, como também em territórios da África tropical. O território brasileiro é um dos grandes centros de diversidade do gênero *Lippia* com aproximadamente 120 espécies conhecidas (GOMES, 2001; PASCUAL, 2001). *Lippia thymoides* é um arbusto aromático com cerca de 1,0 m de altura conhecida popularmente como alecrim de cheiro miúdo (CRAVEIRO et al., 1981) alecrim do mato ou alecrim do campo (PINTO et al., 2013) e na região Amazônica, em especial em Abaetetuba-Pará, é conhecida como manjerona. É uma espécie nativa e endêmica brasileira com distribuição nos estados da Bahia e Minas Gerais nas áreas de vegetação da caatinga e cerrado (SALIMENA, 2014).

As plantas desse gênero têm uma grande importância de uso, como tempero de alimentos, na ornamentação e na medicina popular a qual é utilizada para tratamentos gastrointestinais, relaxante muscular, resfriados, gripes, bronquites e tosse, além de suas flores e folhas servirem como emplastos. A utilização dessa espécie em vários tratamentos na medicina tradicional desencadeou uma série de estudos realizados, em várias áreas, com óleos e extratos comprovando que o gênero *Lippia* tem ação sedativa, antiespasmódica, estomáquica, anti-inflamatória e antipirética, efeito antisséptico e cicatrizante, ação contra a malária, no tratamento de hipertensão, combate à sarna e larvas de *Aedes aegypti* (PASCUAL, 2001; CARVALHO, 2003; GOMES, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Determinar a atividade antimicrobiana do extrato de *Lippia thymoides*, frente a cepa de *Fusobacterium Nucleatum*

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtendo valores de concentração inibitória mínima e sensibilidade
- Identificação dos constituintes químicos do óleo
- Quantificação dos constituintes químicos do óleo

3 MATERIAIS E METODOLOGIA

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 registrado, identificado e incorporado no Herbário “João Murça Pires” do Museu Paraense Emílio Goeldi, em Belém, Pará, sob o número MG 213373.

Figura 1- Fotografia de *Lippia thymoides*



Fonte: Próprio autor

3.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL POR HIDRODESTILAÇÃO

O material botânico (parte aérea) foi colhido 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, depois, triturado em processador.

A extração do óleo essencial das folhas secas de *L. thymoides* foi feita por hidrodestilação (HD), utilizando sistema de vidro do tipo Clevenger modificado acoplado a um 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 sulfato de sódio anidro (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.

Figura 2- Bandeja com a *Lippia Thymoide*



Fonte: Próprio autor

Figura 3- Estufa para a secagem das folhas



Fonte: Próprio autor

Figura 4- Processador para triturar as folhas



Fonte: Próprio autor

Figura 5: Sistema de vidro do tipo Clevenger modificado



Fonte: Próprio autor

Figura 6: óleo após a centrifugação de 5 min a 3000 rpm



Fonte: Próprio autor

Figura 7- Armazenamento em ampola de vidro âmbar



Fonte: Próprio autor

Figura 8- vedação com chama e, acondicionamento em ambiente refrigerado a 5°C.

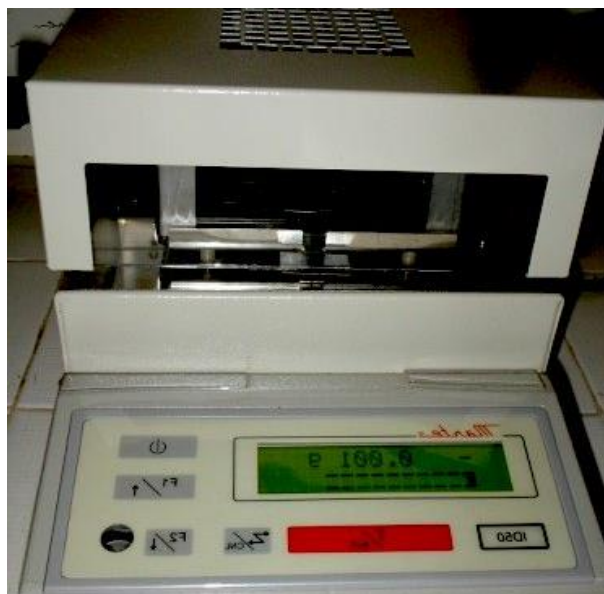


Fonte: Próprio autor

3.3 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE

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

Figura 9- Balança determinadora de umidade da Marte®, modelo ID 50



Fonte: Próprio autor

3.4 CÁLCULO DO RENDIMENTO DO ÓLEO

O rendimento mássico (%) do óleo essencial foi 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 %;

$V_{\text{óleo}}$ é a massa de óleo extraído, em g;

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 μm 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 μL 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 e a ionização 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 literatura (ADMS, 2017).

Figura 10: Shimadzu QP 2010 plus



Fonte: Próprio autor

4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

4.1 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO*

O ensaio microbiológico utilizou-se a cepa do microrganismo padrão: *fusobacterium nucleatum* INCQS (NCTC 11326), de referência em vigilância sanitária- CMRVS, pela fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ INCQS), Rio de Janeiro e pertencente ao banco de padrões do laboratório de controle de qualidade microbiológico de medicamentos do Centro Universitário do Pará-CESUPA.

Obteve-se o inóculo a partir de uma cultura (24 - 48 h) em solução salina 0,85% (m/V). A concentração do microrganismo foi padronizada pela comparação da turbidez do inóculo com a escala MacFarland equivalente a concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC/ml¹⁰ em turbidímetro (equipamento).

Figura 11: Fusobacterium Nucleatum



Fonte: Próprio autor

Figura 12: Turbidímetro



Fonte: Próprio autor

4.1.2 Controle Positivo e Negativo

Utilizou-se o antibiótico vancomicina (sigma-Aldrich[®]) como controle positivo na concentração 16 ug/ml; a cultura do microrganismo em questão avaliado e o meio estéril como controle negativo.

O meio de cultura utilizado para análise foi o ágar e o caldo cérebro e coração (BHI) respectivamente, contendo polissorbato 80 à 0,5% (m/V) e sangue de carneiro desfibrinado.

4.2 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA AMOSTRA PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÀGAR

Placas de 15x100 mm foram preparadas vertidas de 11 ml do Agar BHI . Sobre essa camada de meio solidificado adicionou-se 10 ml do ágar BHI-inóculo contendo 10^6 UFC/ml (F. Brasileira, 2010)

Com as duas camadas de meio uniformemente sobrepostas e já solidificadas, foi sobreposto papel de filtro com diâmetros de aproximadamente 6 e 8 mm (F. Brasileira, 2010) impregnados com 10 μ L de óleo. Analizou-se em triplicata as amostras colocadas sobre a cultura e inoculadas à 35°C/24h em ambiente de anaerobiose (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010; WIKLER ,2006).

Após o período de inoculação as placas foram reveladas com cloreto de trifeniltetrazóico a 7 mg/ml em ágar bacteriológico à 1% (m/V).

Os resultados dos halos em mm foram mensurados com o 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 Wilker (2006). O teste foi realizado em tubos *eppendorfs*®, onde uma alíquota de 50 μ l de óleo foi diluída na proporção 1:2 em caldo BHI com sangue desfibrinado à 5% (V/V) contendo 10^5 UFC/ml até 20 diluições. Em seguida, as culturas foram incubadas à 35°C/24h em ambiente de anaerobiose e realizado em triplicata.

Após o período de incubação as placas foram reveladas pelo semeio de 40 μ l da cultura de cada diluição em placas de Petri (50x50 mm) contendo ágar caseína soja com sangue desfibrinado a 5% (V/V) e incubados por mais 35°C/24 h. As placas foram avaliadas pela presença ou ausência de crescimento, quando comparadas aos grupos controle positivo e negativo. A CIM foi revelada na última diluição onde não houve crescimento microbiano.

Figura 13: Microdiluições em tubos de *ependorfs*®



Fonte: Próprio autor

Figura 14: Semeio de 40 μ l da cultura de cada diluição em placas de Petri (50x50 mm)



Fonte: Próprio autor

5 RESULTADOS

A avaliação da atividade antimicrobiana do óleo frente as cepa de *fusobactérium nucleatum* 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. thymoide* foi efetivo em baixas concentrações frente a bactéria anaeróbica periodontopatogênica. A Concentração Inibitória Mínima de *fusobactérium nucleatum* foi de 1,6 µg /mL, seu teste de sensibilidade a *L. Thymoide* obteve um halo de inibição de 15 mm e como controle positivo o antibiótico de escolha foi a Vancomicina como mostra a Tabela 1.

Tabela 1- Concentração inibitória mínima (CIM) e halo de inibição do óleo essencial de *L. thymoide*

<i>F. Nucleatum</i>	<i>L. Thymoide</i>	Padrão (Vancomicina)
	CIM (µg/ml)	1,6
halo (mm)	15	34

Já na identificação dos constituintes químicos analisada por cromatografia de Fase Gasosa/Espectrometria de Massas, podemos observar que obtivemos o Thymol em maior concentração (59,91) e outros constituintes porém, com menor relevância quando comparados com o thymol.

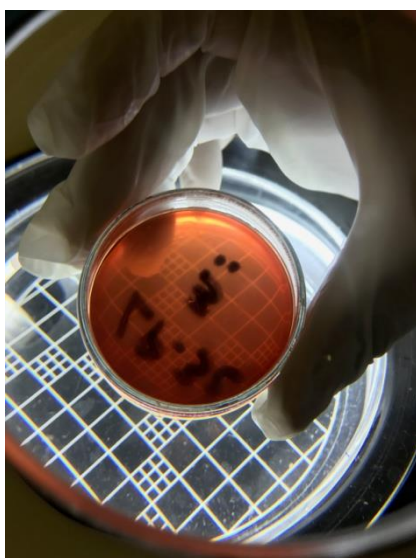
Tabela 2- Identificação dos constituintes químicos do extrato de *Lippia*

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

Foto 15- Mensuração da sensibilidade avaliada por meio de análise descritiva



Fonte: Próprio autor

6 DISCUSSÃO:

No presente estudo nós mostramos a concentração inibitória mínima (CIM- 1,6 µg /mL) e a sensibilidade da *Lippia thymoides* frente ao *Staphylococcus aureus* (alo de 15 mm de inibição) em um modelo in vitro sedimentado e utilizado em outros estudos para avaliar a ação de fitoterápicos como em Sarrazin et al., (2016) e Botelho (2016).

O uso da *Lippia thymoides* tem sido largamente estudada. devido ao seu potencial etnofarmacológico. O gênero da *Lippia* pertence à família *verbenaceae* da qual inclui aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e árvores de pequeno porte distribuídas principalmente na América Central, regiões tropicais da África, América do Norte, América do Sul e Austrália (MUNIR, 1993; SILVA et al., 2006; PASCUAL et al., 2001; GOMES et al., 2011). Silva et al., (2016) afirmam que o óleo essencial da *Lippia thymoides* apresenta composição similar à outras espécies, não havendo variações ocasionadas por fatores climáticos, Cruz et al., (2014) confirmando os achados do trabalho a cima conclui também que esse comportamento poderia possivelmente ser uma característica da espécie *Lippia*, acrescentando que a concentração do principal constituinte de *Lippia gracilis Schauer* apresentou pouca variação entre as estações, demonstrando a estabilidade da composição química dos óleos essenciais mesmo com diferentes condições climáticas.

Em nosso experimento identificamos sua composição química, as propriedades farmacológicas do óleo essencial da espécie *Lippia thymoides* e seu potencial antibacteriano. Outros estudos obtiveram o gênero *lippia* como objeto de pesquisa. Pascual et al., (2001) revisaram extensivamente a química de *Lippia* e descobriram que os componentes com maior frequência nos óleos essenciais desse gênero são o limonene, o β-caryophyllene, o p-cimeno, a cânfora, o linalol, o α-pinene e o thymol. Para Soto-Dominguez et al., (2012) o extrato é considerado não tóxico tanto para análises *in vitro* quanto *in vivo* em camundongos. Na pesquisa realizada por Silva et al, (2015) eles avaliaram extratos brutos e frações de folhas e caules de *Lippia thymoides* a fim de validar seu uso na medicina popular. Foram também observados resultados *in vitro* de atividades antioxidantes e antimicrobianas e além disso foram notados, cicatrização *in vivo* de feridas, tratamento de febre induzida por levedura em ratos jovens e lesão oral aguda em ensaios com camundongos.

A investigação do uso de fitoterápicos como base de medicamentos para tratar a doença periodontal tem sido largamente realizada, pois o desenvolvimento e disseminação da resistência antimicrobiana é uma preocupação atual ao redor do mundo, (WHO, 2012). Novas drogas contra infecções bacterianas, fúngicas e virais estão sendo descobertas para uma

utilização maior e mais abrangente. Para Sibanda (2007) e Vogel (2011) o tradicional conhecimento sobre o potencial terapêutico das plantas tem atraído o interesse científico, buscando novas maneiras de controlar e tratar muitas doenças causadas por microorganismos, dentre elas, a doença periodontal, de característica multifatorial associada a um biofilme disbiótico presente na região cervical dos dentes.

Segundo o recente Estudo Global de Carga de Doenças (GBD, 1990–2010) a periodontite grave é a 6ª doença mais prevalente em todo o mundo em média de 11,2% e cerca de 743 milhões de pessoas afetadas e o ônus global da doença periodontal aumentou em 57,3% de 1990 a 2010 (JIN et al., 2016; KASSEBAUM et al., 2014a; MARCENES et al., 2013; MURRAY et al., 2012). Esses dados demonstram a importância de se pesquisar alternativas de tratamento dessa doença, que tem como terapia convencional, a raspagem e o alisamento radicular e seus coadjuvantes; o uso de antibiótico; bochechos com bases alopáticas e cirurgias corretivas.

Na busca de alternativas no tratamento da doença periodontal através do controle químico da placa bacteriana, nosso estudo focou no óleo essencial da *Lippia thymoides* da região norte do Brasil, obtendo resultados positivos, os quais corroboram com autores como Girão et al. (2001) que observaram redução e prevenção da doença periodontal inicial em cães utilizando a *Lippia Sidoides Kunth*, Botelho et al., (2007) com essa mesma espécie pesquisaram o efeito antimicrobiano contra patógenos orais do gênero *Streptococcus* e *Candida albicans* e ainda no mesmo ano comprovaram a redução da placa bacteriana e da inflamação gengival em ensaio clínico humano. E em estudos mais recentes utilizando espécies da *L. origanoides* e *alba*, Vieira et al. (2014) verificaram efeitos antimicrobianos contra patógenos orais quando usados no tratamento de aftas e abscessos dentários, Freires et al., (2015) também obtiveram resultado antimicrobiano contra patógenos orais e redução de biofilme bacteriano com a *L. origanoides Kunth* o que também foi encontrado por Tofinõ – Rivera et al., (2016) que observaram a erradicação do biofilme de *S. mutans* no tratamento de cárie dentária.

O óleo essencial é largamente utilizado na indústria farmacêutica em forma de colutórios bucais como o Listerine®, o qual tem em sua composição atual apenas 0,064% de timol como observado nas informações do fabricante (LAMBERT PHARMACEUTIAL COMPANY, 1912).

Ao final de 2011 muitos estudos investigaram a efetividade de Listerine® na redução da gengivite e do biofilme bacteriano e Vlachojannis et al., (2013), Vlachojannis et

al., (2016) obtiveram resultados significantes quanto à efetividade e segurança no uso desse produto.

Como fonte inesgotável de investigação sobre a doença periodontal, adjuvantes fitoterápicos tem sido objetos de buscas para que o biofilme, importante no desenvolvimento e progressão da doença periodontal seja diminuído ou eliminado através da ação letal de microorganismos que compõem o biofilme. Por sua diversidade em espécies bacterianas, o biofilme apresenta-se como um difícil fator de controle da doença, e bactérias como a *fusobacterium nucleatum* tem papel importante no desenvolvimento e crescimento por suas características.

É a mais numerosa bactéria Gram-negativa isolada do biofilme da placa dental (Socransky, 1998), ou seja, é uma espécie central no desenvolvimento do biofilme e um patógeno em infecções humanas, incluindo a periodontite. Propriedades importantes da *f. nucleatum* no desenvolvimento de biofilme e patogênese incluem as habilidades de se coagregarem com colonizadores precoces e tardios de biofilmes da placa (KOLENBRANDER, 1993), aderem e invadem células do tecido hospedeiro (HAN, 2000), induzem citocinas pró-inflamatórias (HUANG, 2001), e produzem proteases (BACHARACH, 2004). A coagregação demonstrou ser um mecanismo altamente específico pelo qual as bactérias da placa dental podem interagir fisicamente. Kolenbrander (2009) também relatou em seu trabalho que a *f. nucleatum* atua como “bactéria-ponte” entre colonizadores primários e tardios, devido a sua habilidade de coagregação com outras espécies microbianas, o que explicaria o fato destes microorganismos serem tão numerosos em espécimes clínicos de indivíduos sadios e doentes. Diante disso, nosso trabalho buscou a ação de um fitoterápico que pudesse agir sobre a *fusobacterium* a fim de impedir o crescimento do biofilme em suas fases de colonização seletiva, embora outros autores tenham avaliado a ação de fitoterápicos sobre outros microorganismos (PORTILLO- RUZ et al, 2012; BITU et.al, 2012).

Moro et al., (2018), através de uma revisão sistemática concluíram que fitoterápicos adjuvantes melhoram os parâmetros clínicos da doença periodontal.

Portanto, mesmo sendo escassos estudos sobre o gênero *Lippia* e sua ação sobre bactérias anaeróbicas, podemos observar que resultados importantes sobre estas, fungos e cândida, aumentando a importância da *fusobacterium nucleatum* em nosso trabalho sendo uma anaeróbica periodontopatogênica, com papel central na formação do biofilme bacteriano. Podemos assim sugerir que mais estudos podem ser realizados sobre *L. thymoides* e seu óleo essencial no tratamento de doenças periodontias causadas por tais bactérias.

7 CONCLUSÃO

Estudos sobre bactérias anaeróbicas são escassos pela dificuldade em se cultivar, de manter estabilidade das mesmas e do ambiente adequado durante todo o estudo.

Diante dos resultados alcançados concluiu-se que o óleo essencial da *Lippia thymoides* tem ação inibitória frente à cepa da bactéria anaeróbica *Fusobacterium nucleatum* de concentração inibitória mínima (CIM de 1,6) com um halo de sensibilidade (15mm). A metodologia utilizada para a obtenção e caracterização do óleo foi eficiente juntamente com a identificação e quantificação dos constituintes químicos.

Apesar de muitos estudos mostrarem ação de fitoterápicos do gênero *Lippia* sobre diversas doenças, ainda são escassos sobre doenças da cavidade oral e mais ainda problemas periodontais.

Mesmo o gênero já ter apresentado propriedades farmacológicas importantes de uso tradicional e seu componente como o tymol largamente utilizado no mercado, ainda se faz necessário maiores investigações acerca dos efeitos do óleo essencial da *Lippia thymoides* sobre sua capacidade antibacteriana e sua citotoxicidade.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia brasileira**. Brasília, DF: Anvisa, 2010. v. 2.
- ALMEIDA, M. Z. DE. **Plantas medicinais**. 3. ed. Salvador: EDUFBA, 2011.
- ARMITAGE, G. C, ROBERTSON, P. B. The biology, prevention, diagnosis and treatment of periodontal diseases: scientific advances in the United States. **J Am Dent Assoc**, v. 140, p. 36s-43s, 2009. Suppl. 1.
- BOTELHO MA. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Braz J Med Biol Res.**, v. 40, n. 3, p. 349-356, 2007.
- _____. *Lippia sidoides* and Myracrodruon urundeuva gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 113, n. 3, p. 471-478, 2007.
- _____. Nanotechnology in phytotherapy: antiinflammatory effect of a nanostructured thymol gel from *Lippia sidoides* in acute periodontitis in rats. **Phytotherapy research**, v. 30, n. 1, p. 152-159, 2016.
- CARVALHO, A. F. U. et al. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia thymoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 569-571, 2003.
- COSTA, P. S. et al. Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero *Lippia* sensu lato (Verbenaceae). **Hoehnea**, v. 44, p. 158-171, 2017.
- CRAVEIRO A. A. et al. **Óleos essenciais de plantas do nordeste**. Fortaleza: Ed. UFC, 1981.
- DUNCAN, M. J. Microbiologia das doenças periodontais: patógenos, virulência e ecologia. **Periodontology 2000**, v. 12, p. 66-69, 2007.
- FREIRES, Irlan et al. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 7329-7358, 2015.
- GIRÃO, V. C. C. et al. Efeito protetor do extrato etanólico de *Lippia Sidoides* (alecrim pimenta) nas gengivites marginais de cães. **Ciência Animal**, v. 11, n. 1, p. 13-16, 2001.
- GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, p. 64-77, 2011.

- HAN, Yiping W. et al. Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. **Infection and immunity**, v. 68, n. 6, p. 3140-3146, 2000.
- HIKIBA, H. et al. Ability of fourteen chemical agents used in dental practice to induce chromosome aberrations in Syrian hamster embryo cells. **J Pharmacol Sci.**, v. 97, p. 146–152, 2005.
- JIN, L. J. et al. Global burden of oral diseases: Emerging concepts, management and interplay with systemic health. **Oral Diseases**, v. 22, p. 609–619, 2016.
- KASSEBAUM, N. J. et al. Global burden of severe periodontitis in 1990–2010: A systematic review and meta-regression. **Journal of Dental Research**, 93, 1045–1053.
- KAUFMANN, D.; DOGRA, A. K.; WINK, M. Myrtenal inhibits acetylcholinesterase, a known Alzheimer target. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, p. 1368-1371, 2011.
- KOLENBRANDER, Paul E. Coagregação intergenérica entre bactérias humanas orais e ecologia da placa dentária. **Revisões Anuais em Microbiologia**, v. 42, n. 1, p. 627-656, 1988.
- KOLENBRANDER, Paul E.; LONDON, Jack. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **Journal of bacteriology**, v. 175, n. 11, p. 3247, 1993.
- LAMBERT PHARMACEUTIAL COMPANY. 1912. **Nashville J Med Surg**, CVI. Disponível em: <http://archive.org/stream/nashvillejourn106n11nashuoft/nashvillejourn106n11nashuoft_djvu.txt>. Acesso em:
- MARCENES, W. et al. Global burden of oral conditions in 1990–2010: a systematic analysis. **Journal of Dental Research**, v. 92, p. 592–597, 2013.
- MORO, M. G. et al. Efficacy of local phytotherapy in the nonsurgical treatment of periodontal disease: A systematic review. **Journal of periodontal research**, v. 53, n. 3, p. 288-297, 2018.
- MUNIR, Ahmad Abid. A taxonomic revision of the genus *Lippia* [Houst. ex] Linn.(Verbenaceae) in Australia. **Journal of the Adelaide Botanic Garden**, p. 129-145, 1993.
- MURRAY, Christopher JL et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2197-2223, 2012.
- OLIVEIRA, Thaís Brito et al. The Use of *Lippia* in the Treatment of Periodontal Diseases. **Journal of Dentistry & Public Health**, v. 9, n. 3, p. 227-237, 2018.
- PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.

- PIMENTA, M. R. et al. Floração, germinação e estaquia em espécies de *Lippia* L. (Verbenácea). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, n. 2, p. 211-220, 2007.
- PINTO, C. R. et al. Antimicrobial Activity of *lippia* species from the Brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents hindawi. **Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-5, 2013.
- SALIMENA, F. R. G.; MULGURA, M. *Lippia* in: lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB21457>>. Acesso em: 17 mar. 2014.
- SILVA, M. H. L; ANDRADE, E. H. A; CARREIRA, L. M. M. Essential oil variation in *lippia glandulosa* shauer. **J Essent. Oil Res.**, v.17, p 676-680, nov./dec. 2005.
- SILVA, N. A. et al. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) NE Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 8, n. 3, p. 52-55, 2006.
- SOARES, Bruna Viana; TAVARES-DIAS, Marcos. Espécies de *lippia* (verbenácea), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia**, v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.
- SOCRANSKY, S. S. et al. Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of clinical periodontology**, v. 25, n. 2, p. 134-144, 1998.
- SOTO-DOMÍNGUEZ, Adolfo et al. El extracto acuoso de orégano (*Lippia graveolens* HBK) del norte de México tiene actividad antioxidante sin mostrar un efecto toxico in vitro e in vivo. **International Journal of Morphology**, v. 30, n. 3, p. 937-944, 2012.
- STANLEY, C. HOLT; JEFFREY, L. ERBESOLE. Porphyromonas gengivais, treponema denticola e tanerella forsythia: o complexo vermelho, protótipo de um consórcio patogênico polibacteriano na periodontite. **Periodontology** 2000, v. 12, p. 72, 2007.
- T. SIBANDA; A. I. OKOH. The challenges of overcoming antibiotic resistance: plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 25, p. 2886–2896, 2007.
- TERBLANCHÉ, F. C.; KOENELIUS, G. Essential constituents of the genus *lippia* (verbenácea): a literature review. **Journal Essential Oil Research**, v. 8, p. 471-185, 1996.
- TOFIÑO-RIVERA, A. et al. Effect of *Lippia alba* and *Cymbopogon citratus* essential oils on biofilms of *Streptococcus mutans* and cytotoxicity in CHO cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 194, p. 749-754, 2016.
- VIEIRA, D. R. P et al. Plantas e constituintes químicos empregados em Odontologia: revisão de estudos etnofarmacológicos e de avaliação da atividade antimicrobiana in vitro em patógenos orais. **Rev bras de plantas med.**, v. 16, n. 1, p. 135-167, 2014.

VLACHOJANNIS, Christian; WINSAUER, Heinz; CHRUBASIK, Sigrun. Effectiveness and safety of a mouthwash containing essential oil ingredients. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 5, p. 685-691, 2013.

VOGEL N.W. et al. Assessment of the antimicrobial effect of three plants used for therapy of community-acquired urinary tract infection in Rio Grande do Sul (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1334–1336, 2011.

WIKLER, Matthew A. et al. Methods for dilution antimicrobial. susceptibility tests for bacteria that grow Aerobically: NCCLS document M7-A7. **Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.** Wayne (Pennsylvania), v. 2, n. 26, Jan. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action.** Geneva: World Health Organization, 2012.