

Avaliação da atividade antibacteriana e determinação da CIM do óleo essencial de *Thymus vulgaris* sobre *Streptococcus mutans* e caracterização química do óleo por cromatografia gasosa

SANTOS, R.S.I.¹; PEREIRA, D.F.A.²; TEODORO, G.R.²; CANETTIREI, A.C.V.²; KHOURI, S.²
SALVADOR, M.J.¹

¹Universidade do Vale do Paraíba/ Laboratório de Produtos Naturais e Bioensaios – IP&D/ Av. Shishima Hifumi, 2911 Urbanova São José dos Campos/ rodsignorini@hotmail.com; mjsalvador1531@yahoo.com.br

² Universidade do Vale do Paraíba/ Laboratório de Microbiologia/ Av. Shishima Hifumi, 2911 Urbanova São José dos Campos/ soniak@univap.br

Resumo – Nos últimos anos tem-se observado um aumento na prevalência das doenças periodontais no Brasil e o controle do biofilme bacteriano é de grande importância tanto para o tratamento como para a prevenção da carie e de doenças periodontais. Neste sentido, muitos agentes químicos vêm sendo estudados, dentre eles os produtos naturais, visando possível emprego como adjuvante e terapia de doenças da cavidade oral e na profilaxia de rotina. Assim, este estudo teve por objetivo avaliar o efeito do óleo essencial de *Thymus vulgaris* (Tomilho) frente ao *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), determinando-se sua concentração inibitória mínima. Procedeu-se também a caracterização dos componentes majoritários presentes no óleo bioativo empregando-se a cromatografia gasosa (CG/MS). A CIM obtida para o óleo de tomilho foi de 100 µg/mL, verificando-se por CG/MS a presença de carvacrol, m-cimeno e α -pimeno como constituintes majoritários.

Palavras-chave: Tomilho, *Thymus vulgaris*, atividade antibacteriana, cromatografia gasosa.

Área do Conhecimento: Farmácia.

Introdução

Durante um longo período de tempo, plantas tem sido avaliadas como fonte de produtos naturais para preservar a saúde humana, sendo fonte de drogas, fármacos e medicamentos. O uso de componentes das plantas na área farmacêutica tem gradualmente aumentado no Brasil.

As substâncias naturais, produzidas pelas espécies vegetais, têm atraído pesquisadores de diversas áreas. Nos países em desenvolvimento cerca de dois terços da população utilizam-se de plantas como fonte de fármacos sem nenhum embasamento científico, prática esta que pode dar origem a intoxicações agudas ou crônicas (HARVEY, 2000). No Brasil isto também é uma realidade, acrescida de um agravante, em virtude de se ter, em abundância, espécies vegetais desconhecidas tanto química quanto taxonomicamente. Portanto, estudos que possibilitem traçar o perfil químico, toxicológico e farmacológico dessa riqueza biológica são cada vez mais necessários (BALANDRIN et al., 1985)

Óleos essenciais de plantas geralmente são agentes que apresentam atividade antimicrobiana contra um grande número de microrganismos incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos (SOARES & CURY, 2001). A composição química de óleos essenciais depende do clima, da estação do ano, condições geográficas, período de colheita e a técnica de destilação (SIMÕES et al., 2004). Eles podem apresentar ação tanto contra bactérias Gram-

positivas quanto Gram-negativas e ainda leveduras e fungos filamentosos.

Produtos oriundos de plantas utilizadas na prática odontológica mostraram resultados efetivos sobre o controle da formação da placa bacteriana, podendo interferir na síntese de polissacarídeos (dextrano) agindo nas enzimas que produzem estas substâncias ou sobre a estrutura dentária (PAOLINO et al., 1985). O *Streptococcus mutans* é o principal organismo relacionado a formação da placa dentária e conseqüentemente no surgimento da cárie, devido a sua capacidade de adesão à estrutura dentária. Dependendo de fatores tais como a dieta e a remoção mecânica regular da placa, o tipo de microbiota predominante na cavidade bucal pode variar. Todavia, quando a remoção mecânica da placa é deficiente e a ingestão de carboidratos em geral é freqüente, ocorre uma seleção para certos organismos patogênicos e a placa se torna mais virulenta, podendo resultar tanto em lesões de tecido duro (cáries), quanto de tecido mole (doenças periodontais) (GEBARA et al., 1996). Assim, no presente estudo, buscou-se avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial de tomilho visando a obtenção de produtos farmacêuticos com possível aplicação tanto para o tratamento como para a prevenção da carie e de doenças periodontais.

Material e Métodos

Foram testadas as cepas padrão de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) mantida como cultura pura no Laboratório de Microbiologia da UNIVAP.

O óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho) foi obtido comercialmente pela Ferquima Indústria e Comércio Ltda., onde as concentrações utilizadas foram de 10% a 100% do TTO (diluídas em óleo vegetal de amêndoas- Amêndoas leclerc-Leclerc Industrial Ltda). Clorexidina aquosa 0,2% (L.M. Farma®) foi utilizada como controle positivo na concentração de 0,2mg/mL. Como controle negativo utilizou-se o diluente propilenoglicol/água destilada esterilizada (5:95,v/v).

O inóculo foi preparado obedecendo à escala de Mac Farland 0,5. Com o auxílio de uma alça de platina, cultura fresca da cepa (24h a 37°C) em placas de ágar Tripsina de soja, foram transferidas para tubos contendo 3mL de solução salina estéril à 0,9%, obtendo-se assim o inóculo. Em placas de antibiograma estéreis, pipetou-se 1mL do inóculo homogeneizado e em seguida acrescento-se 70mL de ágar Tripsina de soja a 45-50°C. A mistura foi homogeneizada pela técnica de "Pour-plate". Após a solidificação do meio de cultura, fez-se os poços no agar utilizando canudos plástico estéreis de 5 mm de diâmetro, (BAUER *et al.*, 1996). Os poços foram perfurados em posições equidistantes e o poço do controle positivo foi feito no centro da placa. Pipetou-se 20µL das soluções teste nos poços. O óleo essencial foi avaliado nas concentrações de 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 e 1/16, tendo como diluente propilenoglicol/água destilada esterilizada (5:95). O tempo de pré-difusão foi de aproximadamente 5 horas dentro do fluxo laminar. Após a difusão das soluções no meio de cultura, as placas foram incubadas a 37°C por 24/48h. Dado o período de incubação, a leitura dos halos formados foi feita com régua milimetrada colocada sob a placa. O diâmetro do halo foi anotado em milímetros. Procedeu-se também a determinação da Concentração Inibitória mínima (CIM) do óleo essencial bioativo. Todos os experimentos foram realizados pelo menos em duplicata.

A caracterização química do óleo essencial bioativo foi realizada utilizando a Cromatografia Gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG/MS), determinando-se a % dos constituintes majoritários presentes na amostra.

Resultados

Através de ensaios microbiológicos verificou-se que o óleo essencial de tomilho apresentou considerável atividade frente o *S. mutans* (ATCC 25175) com halos de inibição que variaram de 30

a 2 mm respectivamente entre a maior e menor concentração avaliado (Tabela 1 e Figura 1). A concentração inibitória mínima (CIM) obtida para este óleo essencial foi de 100µg/mL para esta cepa indicadora.

TABELA 1- Concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de Tomilho.

Microrganismo	Diâmetro dos halos de inibição (mm) nas diferentes proporções					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	C+
<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175)	30	28	26	4	2	22

C+: controle positivo (Periogard®),

Como controle negativo empregou-se propilenoglicol/água deionizada esterilizada (5:95) para o qual não observou-se inibição do desenvolvimento microbiano.



FIGURA 1: Avaliação do efeito antimicrobiano do óleo de tomilho sobre *S mutans*.

Os resultados da caracterização química do óleo bioativo esta apresentada na figura 2, onde pode-se analisar os constituintes majoritários.

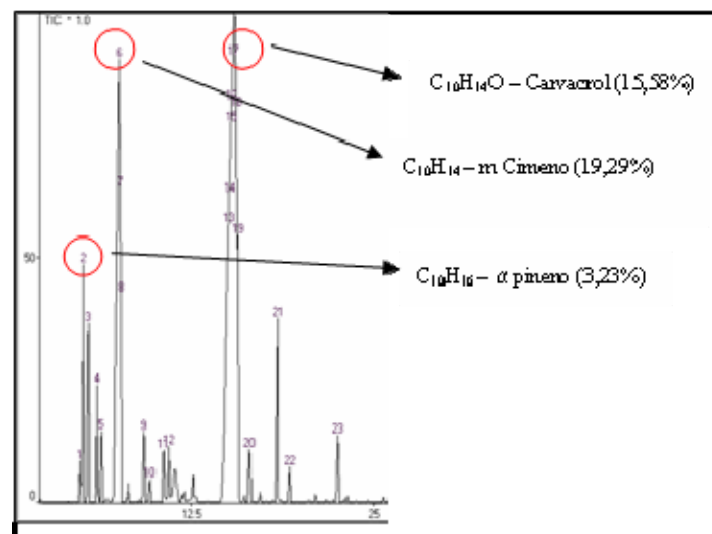


FIGURA 2: Constituintes majoritários do óleo essencial de tomilho empregando a cromatografia gasosa (CG/MS).

Discussão

O interesse por drogas não-convencionais, como os agentes antibacterianos de origem natural, têm aumentado com o propósito de combater doenças infecciosas mostrando que possuem espectro de ação com eficácia frente a diferentes agentes microbianos. Assim, o óleo de tomilho exerceu intensa atividade antibacteriana obtendo-se CIM de 100µg/mL para *S.mutans*.

O *Thymus vulgaris* (tomilho) tem sido usado em fitoterápicos, em cosméticos e em indústrias de alimento. Na medicina ocidental, a aplicação principal está no tratamento de queixas digestivas, de problemas respiratórios e na prevenção e no tratamento de infecções. A atividade biológica do óleo essencial do tomilho esta relacionada a seus principais constituintes, timol e carvacrol. O Timol tem mostrado efeitos antibacterianos, o antifúngico e os antielmínticos (NEEMAN et al.,1995), também tem sido investigado o efeito bactericida do carvacrol (ULTEE et al., 1998). Além disso, dado a presença de substâncias fenólicas, o óleo essencial apresentou significativa atividade antioxidante (DAPHEVICIUS et al., 1998).

Martinez et al. (2005), avaliaram a ação de óleos essencial de plantas utilizadas na medicina tradicional mexicana sobre 324 bactérias isoladas de pacientes pediátricos com infecção serveral sendo 35 amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, 28 amostras de *Escherichia coli*, 14 amostras de *Staphylococcus aureus* entre outras. Neste estudo *Thymus vulgaris*, cujos principais componentes eram 39,7% thymol, 30% L-cymene e 1,7% limonene, apresentou ampla atividade antibacteriana sobre as cepas estudadas com halo médio de inibição de 20.1mm.

No presente estudo, os resultados mostraram atividade antibacteriana do óleo essencial de *T. vulgaris* (Tomilho) frente a *S. mutans* que é um agente importante de doenças da cavidade oral, o que incentiva estudos futuros tanto farmacotécnicos, como para avaliação da atividade biológica visando o desenvolvimento de produtos com aplicação profilática e/ou terapêutica.

Conclusão

Os resultados obtidos comprovam a ação antibacteriana do óleo essencial de *T. vulgaris* (Tomilho) frente a *S. mutans* (ATCC 25175). A CIM obtida para o óleo bioativo foi de 100 µg/mL, verificando-se por CG/MS a presença de carvacrol, m-cimeno e α -pimeno como constituintes majoritários.

Agradecimentos

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Referências

- BALANDRIN, M.F.; KLOCKE, J.A.; WURTELE, E.S.; BOLLINGER, W.H. Natural plant chemicals sources of industrial and medicinal materials. **Science** v.228, p. 1154, 1985.
- BAUER, A.W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized simple disc method. **Am.J.Clin.Pathol.** v.45, p.493-496, 1966.
- DAPHEVICIUS, A., VENSKUTONIS, R., VAN BEEK, T. AND LINSSEN, J.P.H.; *J. Sci.Food Agri.*,77, 140 (1998).
- GEBARA, E.C.E.; ZARDETTO, C.G.D.C.; MAYER, M.P.A. Estudo in vitro da ação antibacteriana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S.sobrinus*. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo** v.10, n.4, p.251-256, 1996.
- HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today** v.5, p. 294, 2000.
- MARTÍNEZ P. H., MIRANDA, B.E.L., SANTOS, F.S. Antibacterial effects of commercial essential oils over locally prevalent pathogenic strains in Mexico / **Fitoterapia** v.76, p453-457, 2005.
- NEEMAN, I., TABAK, M. AND ARMON, R. usp56472695
- PAOLINO, V.J. et al. Inhibition by cocoa extracts of biosynthesis of extracellular polysaccharide by human oral bacteria. **Arch. Oral Biol.** v.30, p.359-363,1985.
- SIMÕES, C.M.O; GUERRA, M.P...[*et al.*], **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. rev. ampl., primeira reimpressão – Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. 1102p.
- SOARES, M.M.S.R.; CURY, A.E. *In vitro* activity of antifungal and antiseptic agents against dermatophyte isolates from patients with tinea pedis. **Braz. J. Microbiol.**, v.32, p.130-134, 2001.
- ULTEE, A., GORRIS, L.G.M. AND SMID, E.J., *J. Applied Microbiology*, 85(2), 211 (1998).