

## AVALIAÇÃO, *IN VITRO*, DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *THYMUS VULGARIS* NA FORMAÇÃO DA PLACA BACTERIANA E DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA PARA USO ORAL

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

<sup>1</sup>Universidade do Vale do Paraíba/ Laboratório de Microbiologia, Av. Shishima Hifumi, 2911 Urbanova São José dos Campos (SP), Brasil/rodsignorini@hotmail.com, soniak@univap.br

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia, Departamento de Fisiologia Vegetal, Curso de Farmácia, Caixa Postal 6109, CEP 13083-970, Campinas (SP), Brasil. mjsalvador1531@yahoo.com.br

**Resumo** – Nos últimos anos têm-se observado um aumento na prevalência das doenças periodontais no Brasil. 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 seu possível emprego como adjuvante e na terapia de doenças da cavidade oral assim como na profilaxia de rotina. Assim, este estudo teve por objetivo avaliar o efeito do óleo essencial de *Thymus vulgaris* (Tomilho) incorporado em uma formulação farmacêutica de uso oral, frente ao *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), determinando-se sua concentração inibitória mínima e o efeito na formação da placa bacteriana. A CIM obtida para o óleo de tomilho foi de 100 µg/mL. Os ensaios de formação da placa bacteriana (ensaios microbianos e análise macroscópica de aderência) confirmaram a eficácia destes produtos naturais, com possível emprego na odontologia preventiva.

**Palavras-chave:** Tomilho, *Thymus vulgaris*, formulação de enxaguatório bucal, atividade antiplaca bacteriana.

**Área do Conhecimento:** Farmácia.

### Introdução

Durante um longo período de tempo as plantas têm sido avaliadas como fonte de produtos naturais para preservar a saúde humana, sendo fonte de drogas, fármacos e medicamentos. O uso de componentes de plantas na área farmacêutica tem gradualmente aumentado no Brasil (MACIEL et al., 2002).

As substâncias naturais produzidas pelas espécies vegetais têm atraído pesquisadores de diversas áreas. Nos países em desenvolvimento, cerca de dois terços da população utilizam determinadas plantas como fonte de fármacos sem nenhum embasamento científico, prática esta que pode dar origem a intoxicações agudas ou crônicas (HARVEY, 2000). Portanto, estudos que possibilitem traçar o perfil químico, toxicológico e farmacológico dessa riqueza biológica são cada vez mais necessários (BALANDRIN et al., 1985).

Este fato tem encorajado diversas investigações científicas, com vistas, por exemplo, a confirmação da atividade antimicrobiana de produtos naturais como os óleos essenciais (NASCIMENTO et al., 2007).

Óleos essenciais geralmente são agentes que apresentam atividade antimicrobiana contra um grande número de microrganismos incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos (CARSON et al., 1995). A composição química de óleos essenciais pode depender do clima, da estação do ano, condições geográficas, período de colheita e da técnica empregada na extração (maceração, destilação, dentre outras). Os óleos essenciais podem apresentar ação tanto contra

bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas e ainda frente a leveduras e fungos filamentosos (SIMÕES et al., 2004).

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 à 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).

A utilização destes produtos fitoterápicos, economicamente mais viáveis, mostra-se como uma alternativa interessante, podendo contribuir para melhorar o acesso da população aos cuidados com a prevenção e tratamento de doenças periodontais. Assim, no presente estudo, buscou-se avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial de tomilho visando à obtenção de produtos farmacêuticos com possível aplicação

tanto para o tratamento como para a prevenção da carie e de doenças periodontais.

## Material e Métodos

O óleo essencial de *T. vulgaris* (Tomilho) foi adquirido comercialmente da empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda. Este óleo essencial foi submetido a caracterização química utilizando a Cromatografia Gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG/MS), determinando-se a porcentagem dos constituintes majoritários presentes na amostra. Esta análise foi realizada na central analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ/USP) pelo Prof. Dr. Marcos José Salvador.

### • **Elaboração das Formulações**

No desenvolvimento das formulações farmacêuticas para uso oral contendo o óleo essencial de tomilho foram empregados os seguintes materiais: água destilada, glicerina, metilparabeno, óleo de mamona hidrogenado, cocoamidopropilbetaína, fosfato de sódio, fluoreto de sódio, corante, sacarina, polivinilpirrolidona e o ativo (óleo essencial de Tomilho) na concentração inibitória mínima e concentração sub-inibitória, seguindo metodologia descrita por CORDEIRO *et. al.*, 2006; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1996, com modificações. Foram preparadas também formulações controles (Branco) contendo todos os excipientes, exceto o princípio ativo, uma contendo o conservante e outra sem conservante. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

### • **Microrganismo Indicador**

Foi utilizada como microrganismo indicador a cepa padrão de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), mantida como cultura pura no Laboratório de Microbiologia da UNIVAP.

### • **Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM)**

Para determinação da CIM utilizou-se a técnica do poço (SALVADOR *et al.*, 2004; NCCLS, 2003) empregando-se meios de cultura Tripsina de Soja (TSB) produzidas pela DIFCO®.

Em placas de petri de vidro com 15cm de diâmetro, colocou-se 1mL do inóculo (0,5 da escala de Mc Farland, correspondendo à  $3 \times 10^8$  UFC/mL), preparado em solução fisiológica a 0,9% a partir de cultura fresca da cepa indicadora (24h a 37°C), e em seguida colocou-se o meio ágar Tripsina de soja a cerca de 40 °C. Após a geleificação do ágar, utilizou-se canudos de plástico estéreis para fazer poços de 5mm de diâmetro.

Em seguida, pipetou-se 20µL das soluções teste e controles 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, v/v). Como controle positivo utilizou-se Gluconato de Clorexidina a 0,12% (Periogard®) e como controle negativo o 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 e o diâmetro do halo de inibição registrado 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.

### • **Verificação da presença de formação de placa bacteriana**

Foram utilizados cerca de 3mL de caldo sacarosado e juntamente com uma bengala de vidro esterilizada (superfície sólida). Neste meio foi preparado o inóculo da cepa padrão de *Streptococcus mutans* - ATCC25175 de acordo com a turbidez 0,5 da escala de Mac Farland. Em seguida foi adicionado, separadamente, cerca de 1mL dos produtos naturais e dos controles nos tubos de caldos sacarosados. Para o controle negativo foi adicionado cerca de 1mL de água destilada estéril e para o controle positivo cerca de 1mL de Clorexidina aquosa à 0,2%. Logo após a preparação em duplicata dos tubos, estes foram incubados em microaerofília a 37°C por 24 e 48 horas.

### • **Avaliação da Atividade Bactericida e/ou Bacteriostática**

Após o período de incubação dos caldos sacarosados, os tubos foram agitados e cerca de 0,15mL foram semeados em placas de ágar Sangue e incubadas nas mesmas condições acima descritas. Para verificação da ação bactericida ou bacteriostática, após 24 e 48h de incubação foi avaliada a formação ou ausência de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) do caldo sacarosado.

## Resultados

Empregando-se 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). A concentração inibitória mínima (CIM) obtida para este óleo essencial foi de 1% (100µg/mL).

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

Microrganismo	Diâmetro dos halos de inibição (mm) nas diferentes concentrações					
	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.

Os resultados da caracterização química do óleo bioativo esta apresentada na figura 1, onde pode-se verificar a presença de carvacrol, m-cimeno e  $\alpha$ -pimeno como constituintes majoritários.

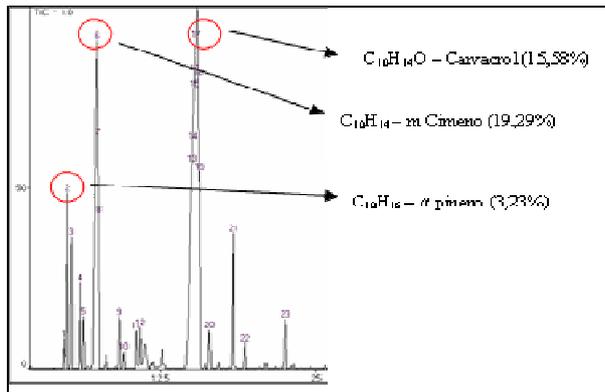


FIGURA 1: Constituintes majoritários do óleo essencial de tomilho empregando a cromatografia gasosa (CG/MS).

Procedeu-se o desenvolvimento de formulações de enxagatário bucal contendo óleo de tomilho a 0,25 (TM 0,25%) e 1% (TM 1%) e formulações controle com e sem conservante e sem o óleo de tomilho os quais foram submetidos a atividade antiplaca e antibacteriana (Tabela 1).

No estudo para verificação da formação de placa constatou-se que na presença das duas formulações contendo óleo de tomilho (0,25 e 1%), não observou-se macroscopicamente aderência de bactérias as bengalas de vidro (Figura 2). Estes resultados estão sendo confirmados por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

TABELA 2- Avaliação do efeito na formação de placa bacteriana e da atividade antibacteriana

e/ou bacteriostática da formulação contendo óleo

Produtos	Avaliação Macroscópica da formação de placa (aderência)	Plaques do caldo (ágar sangue)	Interpretação
Formulação TM 0,25%	-	> 10 <sup>5</sup> Colônias	Viável
Formulação TM 1%	-	0 Colônia	Bactericida
Formulação Controle - Branco com conservante	-	132 Colônias	Bacteriostático
Formulação Controle - Branco sem conservante	-	> 10 <sup>5</sup> Colônias	Viável
Controle negativo -Água destilada esterilizada	+	> 10 <sup>5</sup> Colônias	Viável
Controle positivo - Clorexidina 0,05%	-	0 Colônias	Bactericida

de Tomilho.

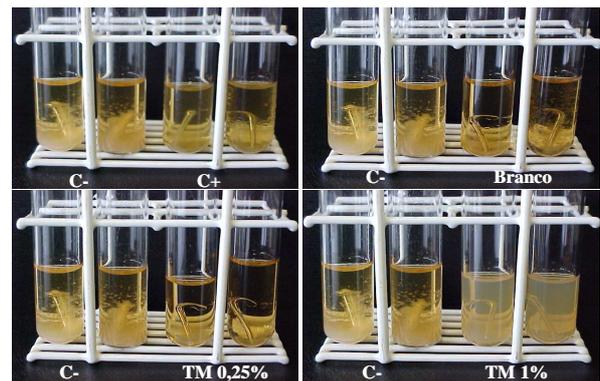


FIGURA 2: Avaliação do efeito na formação de placa bacteriana da formulação contendo óleo de Tomilho.

## 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 (STEFANELLO et al., 2008; MARTÍNEZ et al., 2005).

O óleo essencial de *T. 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 produto de tomilho esta relacionada a seus principais constituintes, timol e carvacrol. Além disso, dado a presença de

substâncias fenólicas, significativa atividade antioxidante tem sido relatada para o óleo essencial de tomilho (DAPHEVICIUS et al., 1998). Martinez et al. (2005), avaliaram a ação de óleos essenciais dentre os quais o óleo essencial de *T. vulgaris*, cujos principais componentes eram 39,7% timol, 30% L-cimeno e 1,7% limoneno, apresentou ampla atividade antibacteriana sobre as cepas estudadas com halo médio de inibição de 20.1mm.

No presente estudo, observou-se que o óleo de tomilho exerceu considerável atividade antibacteriana obtendo-se CIM de 100µg/mL para *S.mutans*. Nas formulações preparadas com TM 0,25% observou-se que macroscopicamente não houve aderência a superfície sólida e no plaqueamento do caldo verificou-se que os microrganismos estavam íntegros, porém na formulação TM 1% também não houve aderência a superfície sólida, mas verificamos que o não houve crescimento dos microrganismos no plaqueamento do caldo, o que indica que nesta concentração o produto é bactericida. Já para as formulações controle (Branco) indicam que o conservante pode estar agindo como coadjuvante frente à cepa indicadora estudada, pois mesmo na ausência do óleo essencial de tomilho (princípio ativo) o produto com conservante reduziu as colônias passando de 100 mil (formulação controle sem conservante) para 132 colônias (formulação controle com conservante). Assim, os resultados mostraram atividade antiplaca bacteriana para as formulações contendo óleo essencial de *T.vulgaris* (tomilho) frente a *S. mutans*, que é um agente importante de doenças da cavidade oral, sendo uma formulação com aplicação profilática e/ou terapêutica potencial.

## Conclusão

Os resultados obtidos comprovam a ação antibacteriana do produto tendo como base *T. vulgaris* (Tomilho) frente a *S. mutans* (ATCC 25175). Os constituintes majoritários detectados por CG/MS no óleo bioativo são carvacrol, m-cimeno e  $\alpha$ -pimeno. Os resultados obtidos indicam ação antiplaca das formulações (TM 0,25 e TM 1%) contendo óleo essencial de *T. vulgaris* (Tomilho) frente a cepa de *S. mutans* (ATCC 25175). Verificou-se também que o conservante utilizado nas formulações pode agir como um coadjuvante, visto que as formulações branco (sem óleo de tomilho) inibiu macroscopicamente a aderência de bactérias a superfície sólida.

## Agradecimentos

À FAPESP e a Faculdade de Ciências da Saúde - UNIVAP pelo apoio financeiro.

## Referências Bibliográficas

- 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.
- CARSON, C. F.; COOKSON, B. D.; FARRELLY, H. D.; RILEY, T. V. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **J. Antimicrob. Chemother.** V.35, p.421-424, 1995.
- CORDEIRO, C.H.G.; SACRAMENTO, L.V.S.; CORRÊA, M.A.; PIZZOLITTO, A.C.; BAUAB, T.M. 2006. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulações para higiene bucal. **Rev. Bras. Ciênc. Farmacêutica** V.42, p.395-406, 2006.
- DAPHEVICIUS, A., VENSKUTONIS, R., VAN BEEK, T. AND LINŠSEN, J.P.H.; Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. **J. Sci.Food Agri.**V.77, p.140,1998.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1996.
- 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, p.251-256, 1996.
- HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today** V.5, p.294, 2000.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, V.F.Jr.; GRYNBERG, N.F.; ECHÉVARRIA, A. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova.** V.25, p.429-438, 2002.
- 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, p.453-457, 2005.
- NASCIMENTO, P.F.C.; NASCIMENTO, A.C.; RODRIGUES, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; SANTOS, P.O.; JÚNIOR, A.M.B.; TRINDADE, R.C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev Bras Farmacogn** V.17, n.1, p.108-113, 2007.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard – Sixth Edition - NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 940 west Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- PAOLINO, V.J.; KASHKET, S. Inhibition by cocoa extracts of biosynthesis of extracellular polysaccharide by human oral bacteria. **Arch. Oral Biol.**,V.30, p.359-363, 1985.
- SALVADOR, M.J.; ZUCCHI, O.L.A.D.; CANDIDO, R.C.; ITO, I.Y.; DIAS, D.A. *In vitro* antimicrobial activity of crude extracts and isolated constituents of *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae). **Pharm. Biol.**, V.42, p.138-148, 2004.
- SIMÕES, C.M.O.; GUERRA, M.P...[et al.]. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. rev. ampl., primeira reimpressão – Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. 1102p.
- STEFANELLO, M.E.; CERVI, A.C.; ITO, I.Y.; SALVADOR, M.J.; WISNIEWSKI Jr., A.; SIMIONATTO, E.L. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Eugenia chlorophylla* (Myrtaceae). **J. Essent. Oil Res.**V.20, p.75-78, 2008.