



MANOELA DE SOUZA ARAÚJO SILVA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE ALECRIM (*Rosmarinus officinalis* Linn.)
SOBRE BACTÉRIAS ORAIS PLANCTÔNICAS**

Recife
2005

Manoela de Souza Araújo Silva

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE ALECRIM (*Rosmarinus officinalis* Linn.) SOBRE BACTÉRIAS ORAIS PLANCTÔNICAS

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Mestrado em Odontologia, com área de concentração em Clínica Integrada, Departamento de Prótese e Cirurgia Buco Facial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Alessandra de A. T. Carvalho

Co-orientadora:

Profa. Dra. Maria Socorro P. Vieira

Recife
2005

Manoela de Souza Araújo Silva

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO
DE ALECRIM (*Rosmarinus officinalis* Linn.) SOBRE BACTÉRIAS ORAIS
PLANCTÔNICAS**

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Mestrado em Odontologia, com área de concentração em Clínica Integrada, Departamento de Prótese e Cirurgia Buco Facial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Aprovado em _____ de 2005.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fábio Corrêa de Sampaio
Departamento de Odontologia da UFPB

Prof. Dr. Geraldo Bosco L. Couto
Departamento de Odontologia da UFPE

Profa. Dra. Ivone Antônia de Souza
Departamento de Farmácia da UFPE

DEDICATÓRIA

A Deus, meu Pai, pela constante presença que faz toda a diferença em minha vida.

Aos meus pais, Rosa e Giovani, aos meus irmãos, a vovó Betinha e aos meus avós “*in memoriam*”, meus amigos de infância.

AGRADECIMENTOS

À *Universidade Federal da Paraíba* (UFPB) por disponibilizar a estrutura laboratorial necessária ao desenvolvimento deste estudo.

À *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE) por contribuir para meu desenvolvimento profissional.

À instituição de apoio à Pós-Graduação, *CAPES*, agradeço a bolsa concedida.

Aos meus amigos, *José Ferreira Lima Júnior e Cleyton Marcelo M. Barbosa* pela amizade e constante presença.

A minha orientadora, Profa. Dra. *Alessandra de A. T. Carvalho* pela disponibilidade às leituras da dissertação, sugestões e constante presença.

À co-orientadora, Profa. Dra. *Maria do Socorro P. Vieira*, do Departamento de Biologia Molecular da UFPB pela acolhida.

À Profa. Dra. *Jane Sheila Higino*, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE, pela produção do extrato de alecrim e por disponibilizar material para o estudo de *Rosmarinus officinalis* Linn.

À bolsista do Departamento de Biologia Molecular da UFPB, *Maria Angélica Ramos da Silva* pelo auxílio no laboratório e pela amizade.

À *Oziclere Sena e Roberta Leão*, secretárias da coordenação do Mestrado, pela amizade e solidariedade.

Às colegas, *Valéria, Sônia, Trícia e Flavinha*, por terem sido tão prestativas e pela alegria do convívio.

Não há intenção de morte em nenhum ser vivo, há, sim, uma eterna luta pela sobrevivência. Se o dano existe, ele revela uma reação, um espírito de revolta contra aquilo que perturbou a aparente calma microbiana, a sofisticada e extremamente delicada vida em superfície.

Manoela de Souza

RESUMO*

Neste estudo foi investigada a capacidade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico de alecrim (*Rosmarinus officinalis* Linn.) sobre bactérias orais planctônicas. Foram utilizados o extrato puro, suas diluições de 1/2 à 1/512, clorexidina e cepas padrão de *Streptococcus mitis* ATCC 98811, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 e *Lactobacillus casei* ATCC 7469. Inicialmente, foi determinada a CIM do extrato de alecrim pelo método de difusão em meio sólido sobre as cepas supracitadas. Em seguida, foi determinada a CIMA do extrato sobre as cepas padrão de *Streptococcus mitis* ATCC 98811, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609, na presença de sacarose a 5%. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e a clorexidina foi utilizada como solução controle. A CIM variou de 66,5 mg/mL a 266 mg/mL e a CIMA de 16 mg/mL a 33,2 mg/mL. Foi observado que o extrato hidroalcoólico puro de alecrim e diluído até 1/16 apresentou ação antimicrobiana sobre as cepas padrão ensaiadas, exceto sobre *Streptococcus mitis* ATCC 98811. Não foi observado efeito inibitório de aderência sobre *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556. *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Lactobacillus casei* ATCC 7469 foram as cepas mais sensíveis à ação antimicrobiana *in vitro* do extrato de alecrim.

Palavras-chave: *Rosmarinus officinalis*; alecrim; *Streptococcus*; bactéria.

* Escrito obedecendo aos preceitos da NBR 14724/ABNT 2002.

ABSTRACT*

The purpose of this study was to investigate antimicrobial activity *in vitro* of the hydro-alcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* Linn. (rosemary) against oral planktonic bacteria. Rosemary extract and its dilutions varied from 1/2 up to 1/512, chlorhexidine, and *Streptococcus mitis* ATCC 98811, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556 *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 and *Lactobacillus casei* ATCC 7469 were utilized. Firstly, MIC was evaluated in a solid medium, and the adherence minimum inhibitory concentration in sucrose at 5%. The assay was conducted in duplicate, and chlorhexidine was control solution. MIC varied from 66,5 mg/mL up to 266 mg/mL and adherence minimum inhibitory concentration from 16 mg/mL up to 33,2 mg/mL. Hydro-alcoholic extract of rosemary had shown antimicrobial action against *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 and *Lactobacillus casei* ATCC 7469. It had not shown antimicrobial action against *Streptococcus mitis* ATCC 98811. It had not show adherence inhibitory effect against *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556. However, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and *Lactobacillus casei* ATCC 7469 had shown the most sensibly bacteria to extract.

Keywords: *Rosmarinus officinalis* ; rosemary; *Streptococcus*; bacteria.

* Escrito obedecendo aos preceitos da NBR 14724/ABNT 2002.

LISTA DE FIGURAS*

FIGURA 1- <i>Rosmarinus officinalis</i> Linn.	21
FIGURA 2- Halos de inibição do crescimento de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 produzidos pelo extrato hidroalcoólico de alecrim através do método de difusão em meio sólido.	29

* Escrito obedecendo aos preceitos da NBR 14724/ABNT 2002.

LISTA DE TABELAS*

TABELA 1 - Média dos halos de inibição do crescimento microbiano produzido pelo extrato hidroalcoólico de alecrim através do método de difusão em meio sólido.	28
TABELA 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico de alecrim sobre cepas padrão na forma planctônica.	29
TABELA 3 - Concentração inibitória mínima de aderência (CIMA) do extrato hidroalcoólico de alecrim determinada pela aderência bacteriana ao vidro na presença de 5% de sacarose.....	30

* Escrito obedecendo aos preceitos da NBR 14724/ABNT 2002.

SUMÁRIO*

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Microbiota oral	14
2.2 Antimicrobianos orais	17
2.3 <i>Rosmarinus officinalis</i> Linn. (alecrim)	20
3 OBJETIVOS	24
3.1 Geral	24
3.2 Específicos	24
4 MATERIAIS E MÉTODO	25
4.1 Obtenção do material botânico e preparo do extrato	25
4.2 Preparo das diluições do extrato hidroalcoólico de alecrim (escala do extrato)	25
4.3 Microrganismos-teste	26
4.4 Determinação da concentração inibitória mínima	26
4.5 Determinação da concentração inibitória mínima de aderência	27
5 RESULTADOS	28
6 DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS	37

* Escrito obedecendo aos preceitos da NBR 14724/ABNT 2002.

1 INTRODUÇÃO*

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto à civilização e, por longo tempo, produtos de origem mineral, vegetal e animal foram as principais fontes de drogas (De PASQUALE, 1984). No contexto da sociedade moderna, é crescente o interesse em terapias alternativas e no uso terapêutico de produtos naturais, especificamente aqueles derivados de plantas (RATES, 2001). Sendo a fitoterapia considerada pela OMS em seu programa de saúde (OMS, 1991).

No Brasil, plantas medicinais são popularmente utilizadas, tanto em áreas urbanas como rurais, sob diversas formas como chá, xarope e tinturas (MATOS, 1997). No entanto, o uso oficial destas fontes terapêuticas nos serviços de saúde requer mais que o conhecimento popular de suas propriedades. O conhecimento científico é requerido para a transformação destas plantas em fonte terapêutica de uso seguro, racional e benéfico (RATES, 2001).

Vários estudos laboratoriais e clínicos empregando plantas medicinais de uso popular são relatados na literatura científica odontológica, ressaltando-se, mais comumente, propriedades antimicrobianas, antiinflamatórias e analgésicas. Desta forma, estes conhecimentos associados ao uso de fitoterápicos pela população podem possibilitar a apresentação de produtos odontológicos contendo substâncias naturais, além da utilização de recursos naturais de forma eficaz e específica.

Rosmarinus officinalis Linn. (alecrim) é um arbusto doméstico de pequeno porte, aromático, cultivado em diversos países, cujo óleo essencial dá respaldo ao seu emprego como aromatizante de alimentos, bebidas e cosméticos. O alecrim é utilizado na medicina popular como antiespasmódico (ALONSO, 1998; AL-SEREITI; ABU-AMER; SEN, 1999; FETROW; AVILA, 2000; NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 2002), analgésico (AL-

*Escrito obedecendo aos preceitos da NBR 14724/ABNT 2002.

SEREITI; ABU-AMER; SEN, 1999; FETROW; AVILA.2000; NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 2002), anti-reumático (AL-SEREITI;ABU-AMER; SEN, 1999), diurético (AL-SEREITI; ABU-AMER; SEN, 1999; ALONSO, 1998), colerético (ALONSO, 1998; SALLÉ, 1996), expectorante (AL-SEREITI; ABU-AMER; SEN, 1999), hepatoprotetor (ALONSO, 1998), antiinflamatório (AL-SEREITI; ABU-AMER; SEN, 1999; FETROW; AVILA, 2000; NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 2002) e antifúngico (AL-SEREITI; ABU-AMER; SEN, 1999; NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 2002). Apresenta ainda, atividade antibacteriana sobre bactérias responsáveis pela deterioração de alimentos (ALONSO, 1998; NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 2002).

O biofilme dental é uma densa massa bacteriana que se forma sobre a superfície do dente, composta por bactérias, macromoléculas provenientes da saliva e do fluido do sulco gengival e por polissacarídeos extracelulares sintetizados pelas bactérias, constituindo a matriz intermicrobiana (UZEDA, 2002).

A inclusão em um biofilme leva o microrganismo a exibir propriedades distintas daquelas exibidas pela sua forma planctônica, isto é, quando seu crescimento ocorre livremente em meio aquoso (COSTERTON et al., 1987; ROSAN; LAMONT, 2000; SBORDONE; BORTOLAIA, 2003).

Tais propriedades conferidas pelo biofilme aos microrganismos são consideradas como resultado de expressão gênica alterada (MARSH; MARTIN, 2001).

Assim, os microrganismos que constituem um biofilme dental mantêm com o hospedeiro uma relação de anfibiose, podendo determinar infecções como a cárie e a doença periodontal (UZEDA, 2002).

A prevenção destas infecções pode ser alcançada através do controle do biofilme dental, o qual pode ser realizado de forma química ou mecânica (AXELSSON, 1993).

Um agente antimicrobiano utilizado no controle químico do biofilme dental é a

clorexidina, uma substância catiônica, com amplo espectro de ação, sendo efetiva contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, vírus e fungos (DENTON, 1991). No entanto, seu uso prolongado pode causar mancha dentária, irritabilidade da mucosa e possível seleção bacteriana (JORGE, 1998).

Sendo assim, parece sensato a busca por antimicrobianos com espectro de ação limitado, direcionado a microrganismos específicos a serem indicados em situações precisas, onde a limpeza mecânica deve ser auxiliada. Esta busca pode residir nas substâncias naturais que são de fácil aquisição e baixo custo.

Diante do exposto, este estudo utilizou cepas bacterianas na forma planctônica de *S. sobrinus* ATCC 27609, *S. mutans* ATCC 25175, *L. casei* ATCC 7469, microrganismos relacionados à cárie, *S. mitis* ATCC 98811 e *S. sanguinis* ATCC 10556, microrganismo envolvido no início do processo de formação do biofilme dental, para avaliação da atividade antimicrobiana do alecrim.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microbiota oral

Por muito tempo na história da microbiologia, os microrganismos foram caracterizados como planctônicos, células livremente suspensas em meio aquoso, e descritos de acordo com sua característica de crescimento em um meio rico em nutriente. A redescoberta, por van Leeuwenhoek, de que microrganismos aderem e crescem em superfícies expostas levou a estudos que revelaram microrganismos associados a superfícies, constituindo um biofilme (DOLAN, 2002).

Biofilmes podem ser encontrados em muitos ambientes líquidos ou semilíquidos, sistemas biológicos, industriais e sistemas aquáticos naturais, não ocorrendo exclusivamente na cavidade oral. (BERNIMOULIN, 2003). A microbiota que o constitui passa a exibir maior resistência às condições ambientais adversas e aos agentes antimicrobianos, comparada àquela exibida quando seu crescimento ocorre em meio aquoso (SBORDONE; BORTOLAIA, 2003).

O biofilme dental é uma densa massa bacteriana que se forma sobre a superfície do dente, composta por bactérias, macromoléculas provenientes da saliva e do fluido do sulco gengival e por polissacarídeos extracelulares sintetizados pelas bactérias, constituindo a matriz intermicrobiana (UZEDA, 2002).

No primeiro ano de vida, a cavidade oral possui cerca de 70% de sua microbiota constituída por *Streptococcus spp*, sendo as primeiras espécies que se instalam como indígenas *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus mitis*. O restante da microbiota é constituído principalmente por *Neisseria spp.*, *Veillonella spp* e estafilococos. Com a erupção dentária, se instalam aquelas com capacidade de fixação como *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis* e algumas espécies de *Actinomyces*, consideradas colonizadoras da fase inicial de formação do biofilme dental (De LORENZO,

2004).

A formação do biofilme dental ocorre inicialmente com a aderência bacteriana à superfície da película adquirida, mediada por adesinas específicas na superfície bacteriana e por receptores no tecido do hospedeiro. Em seguida, ocorre a agregação de bactérias, incapazes de aderir diretamente à película adquirida, às já aderidas, permitindo o desenvolvimento do biofilme dental (ROSAN; LAMONT, 2000).

Dentre a interação adesina-receptores são conhecidas as ligações via lectinas, interações hidrofóbicas, eletrostáticas via íons cálcio salivar, via IgA-S salivar, interação com proteínas salivares ácidas ricas em prolina, com a amilase salivar, entre outras. Seja qual for o mecanismo de adesão utilizado, o aspecto mais importante é que existe um elevado grau de especificidade nestas interações, formando pontes de união, que devem ser firmes e estáveis, para superarem todas as forças que tendem a desalojar a bactéria (De LORENZO, 2004).

Desta forma, as espécies pioneiras, através de seu metabolismo, criam condições favoráveis para a colonização de espécies anaeróbias estritas, aumentando a diversidade da microbiota, constituindo a comunidade-climax. Uma vez estabelecida, a microbiota permanece relativamente estável ao longo do tempo. Esta estabilidade é denominada homeostase microbiana e resulta das interações hospedeiro-bactérias e interbacterianas (MARSH, 2002).

Sendo assim, o biofilme dental é encontrado naturalmente na superfície dos dentes, formando parte das defesas do hospedeiro, por impedir a colonização de microrganismo exógenos e frequentemente patogênicos (MARSH; MARTIN, 2001).

Desta forma, a microbiota oral pode estabelecer uma relação de simbiose (relação harmônica ou de equilíbrio) ou de antibiose (relação desarmônica ou de desequilíbrio) com o hospedeiro, compondo uma microbiota anfibiótica (UZEDA, 2002).

Na manutenção desta homeostase microbiana, a saliva desempenha importante papel.

Propriedades protetoras da saliva como propriedade de limpeza, capacidade tampão e grau de saturação em relação aos minerais do dente são maximizados quando a saliva é estimulada após o consumo de carboidratos fermentáveis, através da redução na queda de pH no biofilme dentário e aumento do potencial de remineralização (EDGAR; HIGHAM; MANNING, 1994).

Em adição, proteínas salivares como lisozimas, lactoferrinas e peroxidases apresentam atividade antimicrobiana direta, agindo em conjunto com os demais componentes da saliva, limitando o crescimento ou destruindo os microrganismos (GONÇALVES; FLÓRIO, 2003).

Embora a microbiota no biofilme dental co-exista harmonicamente com o hospedeiro, alterações no ambiente oral, decorrentes do uso de antimicrobianos ou do aumento na frequência de ingestão de sacarose, podem levar ao aumento na proporção de microrganismos patogênicos específicos (BURNE, 1998). No caso da cárie há aumento na proporção de bactérias acidogênicas e acidúricas, especialmente estreptococos grupo mutans e lactobacilos (BOWDEN, 1990; MARSH, 1999).

Várias linhas de evidências têm conclusivamente estabelecido à relação de açúcares na etiologia da cárie (GUSTAFSSON et al., 1954; HARRIS, 1963; NEWBRUN, 1982; SCHEININ et al., 1976; SHEIHAM, 2001; STEPHAN, 1940; 1944 apud ZERO, 2004).

O biofilme dental formado na presença de sacarose possui duas características únicas, que podem ser responsáveis por sua cariogenicidade. Primeiro, a sacarose é responsável pela formação de um biofilme rico em glicanos insolúveis que aumentam sua porosidade. Este aumento de porosidade facilita a difusão de substratos, os quais são metabolizados por microrganismos acidogênicos, produzindo ácidos orgânicos e resultando em queda de pH no biofilme e perda de minerais. Segundo, na presença de alta frequência de consumo de açúcar, são encontradas no biofilme baixas concentrações de cálcio, fluoretos e fosfatos (CURY et al., 2001).

Sabe-se que a produção de glicanos insolúveis, a partir de sacarose da dieta, aumenta o

potencial patogênico do biofilme dental por promover a aderência e acúmulo de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* no esmalte de animais e humanos (KOO et al, 2000).

Desta forma, o controle do biofilme dental é essencial para manutenção da saúde oral (IACONO et al., 1998; SCHEIE; PETERSEN, 2004). Este controle pode ser realizado de forma química e/ou mecânica.

Neste contexto, o controle do biofilme dental através da remoção mecânica constitui o método mais seguro para impedir sua formação, visto que o biofilme abriga os microrganismos que dão origem à cárie e a doença periodontal (PINTO, 2000).

No entanto, apesar do controle mecânico ter potencial para manter adequados níveis de higiene oral, a experiência clínica e estudos populacionais demonstram que tal método não tem sido empregado de maneira adequada por parte da população (BARNETT, 2003). Sendo a qualidade da limpeza, hábitos comportamentais e motivação do paciente, fatores limitantes reconhecidos (BUISCHI; AXELSSON, 2003; SCHOU, 1998 apud BAEHNI; TAKEUCHI, 2003).

Neste sentido, os agentes antimicrobianos orais podem auxiliar na manutenção de níveis de biofilme dental compatíveis com a saúde oral. Contudo, o uso prolongado destes agentes antimicrobianos não deve romper o equilíbrio da microbiota oral, induzindo a colonização por microrganismos exógenos ou o desenvolvimento de resistência microbiana (MARSH, 1992).

2.2 Antimicrobianos orais

A seleção de uma substância antimicrobiana para controle químico de biofilme dental deve considerar alguns fatores, levando-se em conta a particularidade do meio ambiente oral: deve ser avaliada a toxicidade da substância, a substância deve ser de baixa permeabilidade pelos tecidos bucais, não deve causar desequilíbrio da microbiota residente e deve apresentar

substantividade (CURY, 2003).

Estas substâncias podem agir interferindo na adesão bacteriana à superfície dentária, prevenindo a proliferação bacteriana na superfície dentária e removendo a placa pré-existente (ADDY, 1992).

Um agente antimicrobiano utilizado no controle químico do biofilme dental é a clorexidina, uma substância química catiônica do grupo das bisbiguanidas. Apresenta amplo espectro de ação, sendo efetiva contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, vírus, como herpes vírus, influenzavírus e HIV, e fungos (DENTON, 1991).

No entanto, seu uso por tempo prolongado pode resultar em mancha dentária, irritabilidade da mucosa (AL-TANNIR; GOODMAN, 1994; JORGE, 1998) e alteração gustativa (AL-TANNIR; GOODMAN, 1994).

A clorexidina, por ser um agente catiônico, é adsorvida às superfícies oral e bacteriana carregadas negativamente, interferindo no equilíbrio osmótico bacteriano, formação de película adquirida e adsorção bacteriana ao dente. Em adição, tem sido constatado *in vivo* a capacidade da clorexidina em reduzir a formação de biofilme (DEL BEL CURY, 1994) e de inibir a síntese de polissacarídeos insolúveis da matriz intermicrobiana do biofilme dental (CURY et al., 2000).

Esta ação em um dos fatores de virulência de bactérias cariogênicas tem sido também comprovado, em estudos *in vitro* com tomilho, própolis e cacau (GEBARA et al., 1996), própolis e Arnica montana (KOO et al., 2002), e alecrim (TAKARADA et al., 2004), abrindo a possibilidade do uso de substâncias naturais como antimicrobianos orais.

Gebara; Zardetto e Mayer (1996) analisaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de tinturas de malva, salva, camomila, tomilho, cacau e própolis sobre *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*. Foi observado que as tinturas de tomilho, cacau e própolis mostraram-se efetivas na inibição do crescimento de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus*

sobrinus e da aderência destas bactérias, ao vidro, na presença de sacarose.

Em outro estudo Koo et al. (2000) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de própolis e Arnica montana, sobre microrganismos orais de relevância clínica em odontologia, observando que própolis produziu halos de inibição de crescimento de todos os microrganismos do estudo, incluindo *Streptococcus mutans*. Ainda relata a inibição da aderência de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* à superfície de vidro.

Muitos estudos têm confirmado que as bactérias que constituem um biofilme são menos suscetíveis a antibióticos e antisépticos quando comparada a forma planctônica destas bactérias (FINE; FURGANG; BARNETT, 2001; THROWER; PINNEY; WILSON, 1997; WILSON, 1996).

Este aumento de resistência bacteriana conferida pelo biofilme resulta de alguns fatores, incluindo diferenças fenotípicas, diferentes níveis de metabolismo bacteriano em vários sítios no biofilme e inibição de difusão do agente antimicrobiano (COSTERTON et al., 1994).

O crescimento bacteriano formando um biofilme pode induzir ou reprimir genes que normalmente não são expressos durante o crescimento planctônico (MARSH; MARTIN, 2001). No entanto, pouco se conhece sobre a expressão gênica e a organização espacial das espécies em um biofilme (KOLENBRAND, 2000).

Neste contexto, modelos de biofilmes produzidos *in vitro* têm sido desenvolvidos. Guggenheim et al. (2001) utilizou um modelo de biofilme dental supragengival constituído por múltiplas espécies bacterianas para analisar a composição e aderência do biofilme, o qual foi exposto à antisépticos orais.

Thrower; Pinney e Wilson (1997) produziram *in vitro* biofilme de 1 e 3 dias constituído por *Actinobacillus actinomycetemcomitans* para verificar a suscetibilidade bacteriana ao digluconato de clorexidina e triclosan.

Segundo Cury (2003), o controle químico do biofilme dental seria direcionado a indivíduos não motivados para um adequado controle do biofilme, à pacientes portadores de aparelhos ortodônticos fixos, àqueles submetidos à radioterapia, no pós-operatório de cirurgias bucais na impossibilidade de remoção mecânica do biofilme e a pacientes com necessidades especiais.

2.3 *Rosmarinus officinalis* Linn. (alecrim)

Rosmarinus officinalis Linn. (Figura 1) é um arbusto doméstico, aromático, da família *Labiatae*, medindo cerca de um metro de altura com flores azuladas e pequenas folhas verde-escuras que abrigam pequenas glândulas contendo óleo aromático. O alecrim é cultivado em vários países europeus e cresce ao longo de toda a costa do Mediterrâneo, sendo a planta mais antiga cultivada por estes povos (AL-SEREITI; ABU-AMER ; SEN, 1999).

Diferentes espécies de alecrim existem em todo o mundo: *R. officinalis*, *R. eriocalyx*, *R. laxiflorus* e *R. lavandulaceus*. *Rosmarinus officinalis* Linn. é apenas uma das espécies que cresce nas regiões do Mediterrâneo (ANGIONI et al., 2004). É também conhecida como rosemary ou romero e, hoje, é cultivada em todo o mundo, crescendo bem em solo semi-árido rico em calcário, sendo cultivada com sucesso nas serras cearenses (MATOS, 2002).

Um aspecto relevante em relação ao alecrim é que ele faz parte da farmacopéia de diversos países, entre eles a Alemanha, Argentina, Austrália, Bélgica, Espanha, França, Inglaterra, México, Portugal, República Tcheca e Suíça (Mc CALEB, 1993). Ademais, o alecrim foi classificado pelo Conselho Europeu como aromatizante natural, categoria N₂, a qual indica que o alecrim pode ser adicionado aos alimentos em pequenas quantidades (COUNCIL OF EUROPE, 1981).



FIGURA 1 - *Rosmarinus officinalis* Linn.

O alecrim é utilizado na medicina popular como antiespasmódico (AL-SEREITI; ABU-AMER; SEN, 1999; ALONSO, 1998; FETROW; AVILA, 2000), analgésico, antiinflamatório (AL-SEREITI; ABU-AMER; SEN, 1999; FETROW; AVILA, 2000; NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 2002), antireumático, expectorante (AL-SEREITI; ABU-AMER; SEN, 1999), diurético (AL-SEREITI; ABU-AMER; SEN, 1999; ALONSO, 1998), colerético (ALONSO, 1998; SALLÉ, 1996), hepatoprotetor (ALONSO, 1998), e antifúngico (AL-SEREITI; ABU-AMER; SEN, 1999; NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 2002). Além de apresentar potencial terapêutico no tratamento de hepatotoxicidade, asma brônquica, úlceras pépticas, doenças inflamatórias, doenças cardíacas isquêmicas, astenozoospermia e na prevenção de carcinogênese (AL-SEREITI; ABU-AMER; SEN, 1999).

Seu óleo essencial é composto principalmente por hidrocarbonetos monoterpênicos, (α -pineno, β -pineno, canfeno, mirceno e limoneno), ésteres terpênicos (1,8-cineol), cânfora, linalol, verbinol, terpineol, 3-octanona, isobornil-acetato, β -cariofileno, entre outros. Os terpenóides são representados pelo carnosol (diterpeno), ácidos oleânico e ursólico, 2- β -OH-

oleanólico, 3-O-acetiloleanólico, ácido carnosílico, rosmaridienol, 7-metóxi-rosmarol, α e β -amirenona, entre outros. Os flavonóides incluem diosmetina, diosmina, gencuanina, apigenina, 6-metóxi-gencuanina, hispidulina, luteolina (e derivados), 6-metóxi-homoplantagina, circimarina, nepriteína, sinensetina, cupafolina, 7-metoxi-fegopolina. Os fenóis são os ácidos caféico, clorogênico, labiático, neoclorogênico e rosmarínico (ALONSO, 1998).

Estudos em animais revelaram como compostos biologicamente ativos no alecrim o α -pineno, β -pineno, diosmina, 1,8-cineol, borneol, ácido rosmarínico, rosmaricina (derivados), além do carnosol e ácido ursólico, aos quais é atribuída a atividade antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus brevis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhodotorula glutinis* e *Kluyveromyces bulgaricus* em alimentos deteriorados (NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 2002; ALONSO, 1998). Ainda é relatada a atividade sobre *Staphylococcus albus*, *Corynebacterium spp.*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes* (ALONSO, 1998).

Offord et al. (1997) ainda atribuem ao carnosol e ao ácido ursólico a prevenção de danos ao DNA de cultivos celulares causados por aflatoxina, um potente carcinogênico hepático.

O óleo essencial de alecrim não é irritante nem sensibilizante quando aplicado à pele humana (TISSERAND; BALACS, 1995). O ácido rosmarínico possui baixa toxicidade, de acordo com a DL_{50} de 561 mg/Kg iv e, é rapidamente eliminado da circulação, iv, $t_{1/2} = 9$ min. (PARNHAM; KESSELRING, 1985).

Takarada et al. (2004) demonstraram, através de estudo *in vitro*, a ação antimicrobiana de diferentes óleos essenciais, entre eles o de alecrim, em concentrações variando de 0,002% a 1% sobre *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum*.

Por outro lado, Angioni et al. (2004), em outro estudo *in vitro* da atividade

antimicrobiana do óleo essencial de alecrim sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, relatam a baixa atividade antimicrobiana deste óleo sobre estas amostras estudadas, com concentração inibitória mínima sempre acima de 900 µL/mL.

No entanto, considerando-se sua ação antifúngica, estudos *in vivo* demonstraram que quando uma emulsão aquosa do óleo essencial de alecrim é aplicada na boca 5 vezes ao dia, em pacientes que não respondem ao tratamento com Nistatina®, a lesão desaparece completamente no período de 2 a 4 dias (DURAKOVIC; DURAKOVIC, 1979).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Verificar a ação antimicrobiana e efeito antiaderente, *in vitro*, do extrato hidroalcoólico de *Rosmarinus officinalis* Linn.(alecrim) sobre cepas padrão de *Streptococcus mitis* ATCC 98811, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Lactobacillus casei* ATCC 7469.

3.2 Espécíficos

3.2.1 Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico de alecrim sobre cepas padrão de *Streptococcus mitis* ATCC 98811, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Lactobacillus casei* ATCC 7469, pelo método de difusão em meio sólido;

3.2.2 Determinar a concentração inibitória mínima de aderência (CIMA) do extrato sobre as cepas padrão supracitadas, exceto *Lactobacillus casei* ATCC 7469.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Obtenção do material botânico e preparo do extrato

A matéria-prima (folhas e caule) de *Rosmarinus officinalis* Linn. foi obtida no canteiro de plantas do biotério do Departamento de Antibióticos do Campus da UFPE, Recife, Pernambuco, Brasil e classificado pela etnobotânica Profa. Dra. Alda Chiappeta do Departamento de Antibióticos, CCB/ UFPE. Folhas e caule foram separados, pesados, lavados em água corrente e submetidos ao processo de maceração por 19 dias à temperatura ambiente. Nesta etapa, foi utilizada como solução extrativa uma solução hidroalcoólica a 80% por se tratar de uma planta aromática, rica em óleos essenciais, visando à obtenção de todos os componentes químicos do alecrim durante a maceração, segundo protocolo do Laboratório de Fitomedicamentos do Departamento de Farmácia da UFPE. Assim, foram utilizados 1400 mL de solução hidroalcoólica a 80% v/v (etanol/ água destilada) para 350,5g de matéria prima fresca. Decorrido o período de maceração, o material foi filtrado, obtendo-se 1335 mL de extrato, havendo perda por evaporação de 65 mL. Após filtração, o extrato foi acondicionado em frascos âmbar previamente limpos e secos, e estocados em câmara fria.

Foi obtido um extrato de cor verde-oliva, odor cítrico adocicado e sabor adstringente, levemente amargo.

4.2 Preparo das diluições do extrato hidroalcoólico de alecrim (escala do extrato)

Dez tubos de ensaio foram numerados de 1 a 10. No tubo 1 foram adicionados 2 mL de extrato puro e nos demais tubos 1 mL de água destilada. Em seguida, com uma pipeta foi transferido 1 mL do extrato contido no tubo 1 para o tubo 2, obtendo-se uma diluição correspondendo à metade da concentração do extrato puro. Este mesmo procedimento foi repetido mais 8 vezes, sempre retirando 1 mL da diluição obtida para o tubo seguinte, contendo 1 mL de água destilada, obtendo-se concentrações decrescentes do extrato.

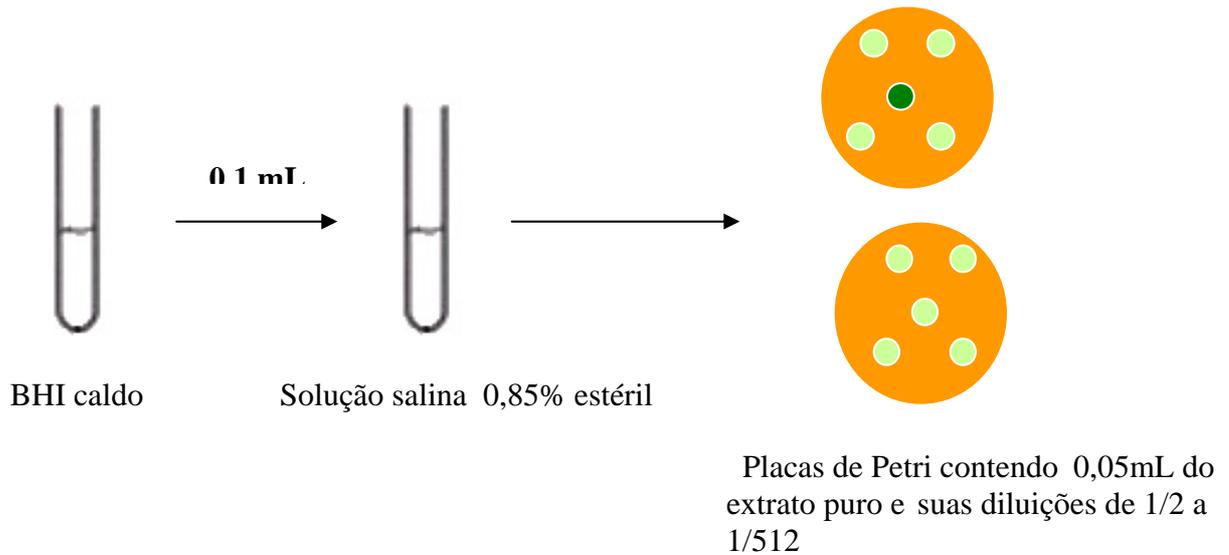
4.3 Microrganismos-teste

Neste estudo foram utilizadas cepas padrão de *Streptococcus mitis* ATCC98811, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus mutans* ATCC2517, *Streptococcus sobrinus* ATCC27609 e *Lactobacillus casei* ATCC 7469, obtidas na Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tozello” (Campinas- SP) e Instituto Adolfo Lutz (São Paulo-SP). As cepas foram transportadas em ágar sangue inclinado (“slants”) e, posteriormente, reativadas no Laboratório de Genética de Microrganismos – Departamento de Biologia Molecular, CCEN da UFPB.

4.4 Determinação da concentração inibitória mínima

A determinação da CIM do extrato hidroalcoólico de alecrim foi realizada, pelo método de difusão em meio sólido, sobre cepas padrão bacterianas, segundo a metodologia de Cleland e Squires (1991).

As cepas foram cultivadas em BHI caldo (Brain Heart Infusion – Difco) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18-20 horas em microaerofilia pelo método da chama da vela. Decorrido este período, 0,1 mL do cultivo foi diluído em 10 mL de solução salina 0,85% estéril para em seguida ser espalhado em placas de Petri contendo o meio ágar Müeller- Hinton- Difco. Neste meio foram realizadas perfurações (“poços”) de aproximadamente 6mm de diâmetro, onde foi colocado um volume de 0,05mL do extrato puro e suas diluições de 1/2 a 1/512, cujas concentrações variaram de 266 a 0,5 mg/mL. As placas foram incubadas a 37°C em microaerofilia, por um período de 24 horas. Foram realizados estudos comparativos com o digluconato de clorexidina a 0,12% e com solução hidroalcoólica a 80% . Os ensaios foram realizados em duplicata frente a cada cepa padrão ensaiada. A CIM foi considerada a menor concentração do extrato hidroalcoólico de alecrim que inibiu completamente o crescimento bacteriano, identificada como o primeiro poço que, em ordem ascendente de concentração do extrato produziu halo de inibição.



4.5 Determinação da concentração inibitória mínima de aderência

A CIMA do extrato hidroalcoólico de alecrim foi determinada segundo a metodologia de Gebara, Zardetto e Mayer (1996), na presença de sacarose a 5%, usando-se o extrato puro e suas diluições, cujas concentrações variaram de 266 a 0,5 mg/mL. As cepas foram cultivadas a 37°C “overnight” e 0,03mL de inóculo foi transferido para um recipiente contendo 30 mL de Müller Hinton- Difco e incubado em microaerofilia por 1 hora a 37°C (sub-cultivo). Após este período, 1,8 do sub-cultivo foram distribuídos em 10 tubos de hemólise, os quais foram numerados de 1 a 10 de acordo com a escala do extrato. Em seguida foram adicionados 0,2 mL do extrato e suas diluições em cada tubo. A incubação foi feita a 37°C por 24 horas em microaerofilia, com os tubos inclinados a 30°. A leitura foi realizada através da observação visual da aderência bacteriana ao vidro após agitação do mesmo. A CIMA foi considerada a menor concentração do extrato hidroalcoólico de alecrim que, em meio com sacarose impediu completamente a aderência bacteriana ao vidro.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos do estudo da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico de alecrim, pelo método de difusão em meio sólido, demonstraram que o extrato de alecrim apresentou ação antimicrobiana sobre as cepas padrão de *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Lactobacillus casei* ATCC 7469. Não sendo observada ação antimicrobiana do extrato de alecrim sobre *Streptococcus mitis* ATCC 98811 (Tabela 1). As concentrações inibitórias mínimas variaram de 66,5 mg/mL a 266 mg/mL (Tabela 2). A figura 1 representa a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico de alecrim, em termos de halos de inibição, do crescimento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Tabela 1 - Média dos halos de inibição do crescimento microbiano produzido pelo extrato hidroalcoólico de alecrim através do método de difusão em meio sólido.

Cepas padrão	Concentração do extrato de alecrim (mg/mL)_____				33,2
	266	133	66,5	33,2	
	≤ 16,0				
<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556	15	-	-	-	-
<i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 27609	15	-	-	-	-
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	18	15	11	-	-
<i>Straptococcus mitis</i> ATCC 98811	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469	18	15	11	-	-

(-) ausência de inibição de crescimento.

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico de alecrim determinada através do método de difusão em meio sólido.

Cepas padrão	Concentração inibitória mínima (mg/mL)
<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556	266
<i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 27609	266
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	66,5
<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 98811	-
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469	66,5

(-) ausência de inibição de crescimento.

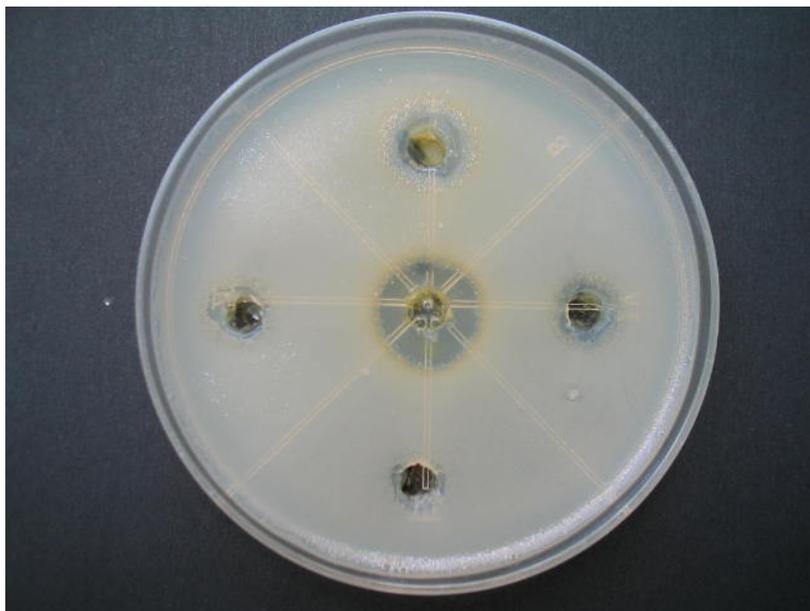


FIGURA 2 - Halos de inibição do crescimento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 produzidos pelo extrato hidroalcoólico de alecrim através do método de difusão em meio sólido.

Os resultados da concentração inibitória mínima de aderência, em caldo Müller-Hinton acrescido de 5% d sacarose, do extrato hidroalcoólico de alecrim frente as cepas padrão de *Streptococcus mitis* ATCC 98811, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 e *Streptococcus mutans* ATCC 25175 estão

presentados na tabela 3.

Cepas padrão	Concentração inibitória mínima de aderência (mg/mL)
<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556	-
<i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 27609	33,25
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	16,0
<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 98811	33,25

Tabela 3 - Concentração inibitória mínima de aderência (CIMA) do extrato hidroalcoólico de alecrim determinada pela aderência bacteriana ao vidro na presença de 5% de sacarose. (-) ausência de inibição de aderência.

6 DISCUSSÃO

Os testes com agentes antimicrobianos sobre bactérias orais planctônicas podem ser muito úteis, uma vez que podem qualificar o agente para tratamento de infecções orais biofilme-dependentes, ou desqualificá-lo, caso estes testes demonstrem resultados negativos (COSTERTON et al., 1987).

O estudo com o o extrato hidroalcoólico de alecrim demonstrou atividade antimicrobiana sobre as cepas de *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Lactobacillus casei* ATCC 7469. Esta ação, no entanto, não foi observada sobre *Streptococcus mitis* ATCC 98811, um componente da microbiota não patogênica. Foram observados halos de inibição de crescimento bacteriano que variaram de 11mm a 18mm de diâmetro, havendo diminuição destes halos à medida que a concentração do extrato foi diminuída.

A CIM foi considerada a menor concentração do extrato hidroalcoólico de alecrim que inibiu completamente o crescimento bacteriano, ou seja, a menor concentração do extrato que produziu halo de inibição, sendo equivalente a 66, 5 mg/mL para *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Lactobacillus casei* ATCC 7469 e a 266 mg/mL para *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556 e *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609.

De acordo com os dados apresentados, pôde-se verificar que o extrato de alecrim apresentou para as cepas padrão duas CIMs: 266 mg/mL e 66, 5 mg/mL. Estas concentrações corresponderam ao extrato puro e a diluição de 1/4, respectivamente.

Estes achados sugerem que o extrato em estudo possui compostos bioativos com atividade antimicrobiana *in vitro* sobre as cepas de *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Lactobacillus casei* ATCC 7469.

Sabe-se que alguns fatores devem ser considerados na seleção de um agente antimicrobiano oral, dentre eles, a substância não deve causar desequilíbrio da microbiota não residente (CURY, 2003; MARSH; MARTIN, 2001).

Neste contexto, o extrato hidroalcoólico de alecrim torna-se uma substância promissora, visto a ausência de atividade antimicrobiana deste extrato sobre *Streptococcus mitis* ATCC 98811, um componente da microbiota não patogênica.

As glicanas sintetizadas por microrganismos do biofilme dental, a partir da sacarose da dieta, participam ativamente na aderência bacteriana, sendo esta aderência induzida por este polissacarídeo extracelular um importante mecanismo na colonização de *Streptococcus mutans* na superfície dentária (UZEDA, 20002).

Neste contexto, o uso de agentes antimicrobianos que alterem a aderência bacteriana ao dente tem grandes vantagens, em particular, pouca ou nenhuma alteração da microbiota é esperada com o seu uso prolongado (GEBARA; ZARDETTO; MAYER, 1996).

O extrato de alecrim apresentou efeito inibitório de aderência de todas as cepas padrão representado pela ausência de aderência, na presença de sacarose, à superfície do vidro. Porém não foi observado efeito inibitório de aderência sobre *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556. As menores concentrações do extrato que apresentaram ação inibitória de aderência foram de 16 mg/mL para *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e de 33,25 mg/mL para *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 e *Streptococcus mitis* ATCC 98811. Estas concentrações corresponderam às diluições de 1/16 e 1/8, respectivamente.

A literatura odontológica relata resultados de vários estudos nos quais a concentração inibitória mínima de agentes contra bactérias cariogênicas e periodontopatogênicas tem sido pesquisada (WILSON, 1996). No entanto, poucos relatos foram encontrados sobre a utilização do alecrim contra microrganismos de relevância clínica em odontologia.

Corroborando os achados deste estudo, Takarada et al. (2004) afirmam que o óleo essencial de alecrim possui efeito inibitório de aderência, em concentrações de 0,20% a 0,50%, sobre *Streptococcus mutans*. Contudo, de forma contrária aos achados aqui apresentados, afirmam que o alecrim não apresentou efeito inibitório do crescimento de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, embora tenha apresentado atividade inibitória de crescimento de bactérias Gram-negativas como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *F. nucleatum*.

Estudos semelhantes ao aqui descrito foram desenvolvidos, utilizando-se extratos de diferentes plantas, para verificação de atividade antimicrobiana sobre bactérias orais.

Gebara; Zardetto e Mayer (1996), analisando a atividade antimicrobiana *in vitro* de diferentes tinturas naturais, observaram atividade inibitória do crescimento e aderência de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* pelas tinturas de tomilho, cacau e própolis., cujas CIMs foram de 0,06mg/mL, 0,10mg/mL e 0,04mg/mL, respectivamente sobre *Streptococcus mutans* e de 0,04mg/mL, 0,12mg/mL e 0,02mg/mL sobre *Streptococcus sobrinus*. As CIMA de tomilho, cacau e própolis foram de 0,02mg/mL, 0,04mg/mL e 0,01mg/mL, respectivamente para as cepas de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*.

Koo et al. (2000) estudando a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de própolis e Arnica montana contra bactérias orais de relevância clínica em odontologia, observaram que própolis inibiu o crescimento microbiano de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus*, *Actinomyces naeslundii*, *Porphyromonas gingivalis*, dentre outros, produzindo halos médios de 2mm, 4,42mm, 2,25mm, 9,25mm e 3,42mm, respectivamente. Arnica montana mostrou halos de 0,33mm e 0,48mm sobre *Actinomyces naeslundii* e *Porphyromonas gingivalis*. Ainda, demonstraram a inibição de aderência de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, na concentração de 400µg/mL destes extratos.

Estudos investigando a efetividade de agentes antimicrobianos sobre bactérias têm indicado que resultados consideravelmente diferentes podem ser obtidos quando o estudo é realizado sobre bactérias planctônicas e organizadas em biofilme (FINE; FURGANG; BARNETT, 2001).

O crescimento bacteriano formando um biofilme pode induzir ou reprimir genes que normalmente não são expressos durante o crescimento planctônico (MARSH; MARTIN, 2001). No entanto, pouco se conhece sobre a expressão gênica e a organização espacial das espécies em um biofilme (KOLENBRAND, 2000).

Sabendo-se que na cavidade oral os microrganismos estão aderidos à superfície dentária, o desenvolvimento de biofilmes orais *in vitro* representa um avanço no estudo de agentes antimicrobianos orais. A utilização destes modelos de estudo *in vitro* possibilita a demonstração de que bactérias em um biofilme possuem diferentes propriedades comparadas à condição planctônica (BAEHNI; TAKEUCHI, 2003).

Thrower; Pinney e Wilson (1997) analisando a suscetibilidade *in vitro* de biofilmes e suspensão planctônica de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* à antisépticos orais, afirmam que biofilmes de três dias foram os mais resistentes à ação dos antisépticos, sendo o digluconato de clorexidina o antiséptico mais ativo.

Guggenheim et al. (2001) desenvolveram modelo *in vitro* de biofilme dental supragengival, constituído de múltiplas espécies microbianas, observando que a exposição deste biofilme à clorexidina ou a triclosan levou a uma redução de bactérias viáveis semelhante àquela observada *in vivo*.

A capacidade da clorexidina em reduzir a formação de biofilme tem sido constatado *in vivo* por Del Bel Cury (1994). Em adição, Cury et al. (2000) relata a inibição da síntese de polissacarídeos insolúveis da matriz intermicrobiana do biofilme pela clorexidina.

Os resultados obtidos destes estudos, utilizando biofilmes dentais produzidos *in vitro*

para teste de agentes antimicrobianos orais, podem ser mais preditivos de atividade clínica (WILSON, 1996). Estes estudos podem ser úteis em testes pré-clínicos destes agentes, em concentrações clinicamente relevantes (GUGGENHEIM et al., 2001; FINE; FURGANG; BARNETT, 2001).

Sendo assim, os achados do estudo aqui descrito sugerem que o alecrim possui compostos bioativos com atividade antimicrobiana *in vitro*. No entanto, a relevância clínica destes achados necessita de avaliação utilizando modelos de estudo que possam reproduzir situações mais próximas àquelas encontradas na cavidade oral.

Ainda, é oportuno ressaltar que este estudo não teve a pretensão de buscar mais um antimicrobiano oral, mas, sim, a busca de um fitoterápico a ser utilizado em odontologia, em situações precisas, onde a remoção mecânica do biofilme dental deve ser auxiliada, dentro de uma estratégia racional de prevenção de infecções orais biofilme-dependentes, contribuindo para utilização de modo seguro e específico, de fontes terapêuticas disponíveis na flora brasileira.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se:

- O extrato hidroalcoólico de alecrim apresentou ação antimicrobiana, *in vitro*, sobre as cepas padrão de *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Lactobacillus casei* ATCC 7469. Não sendo observada ação antimicrobiana do extrato de alecrim sobre *Streptococcus mitis* ATCC 98811.
- O extrato hidroalcoólico de alecrim apresentou efeito inibitório de aderência, *in vitro*, sobre as cepas padrão de *Streptococcus mitis* ATCC 98811, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 e *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Não sendo observado efeito inibitório de aderência *in vitro* do extrato de alecrim sobre *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556.

REFERÊNCIAS *

- ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina: Bases clínicas y farmacológicas.** Isis: Buenos Aires, 1998, p. 845-849.
- AL-SEREITI, M. R.; ABU-AMER, K.M.; SEN, P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis Linn.*) and its therapeutic potentials. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 37, p. 124-130, Feb. 1999.
- AL-TANNIR, M.A; GOODMAN, H. S. A review of chlorhexidine and its use special populations. **Spec. Care Dentist.**, v. 14, n. 3, p.116-122, 1994.
- ANGIONI, A.; BARRA, A.; CERETI, E.; BARILE, D.; CAISSON, J. D.; ARLORIO, M.; DESSI, S.; CORONEO, V.; CABRAS, P. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of the *Rosmarinus officinalis Linn.* **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 3530-3535, 2004.
- AXELSSON, P. Currente of pharmaceuticals in prevention of caries and disease. **Int. Dent. J.**, v. 43, n. 5, p. 473-482, 1993.
- BAEHNI, P.C.; TAKEUCHI, Y. Antiplaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. **Oral Disease**, n. 9, Suppl.1, p. 23-29, 2003.
- BARNETT, M. L. The rote of therapeutic antimicrobial mouthrinses in clinical practice: control of supragingival plaque and gingivitis. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 134, n. 6, p. 699- 704, Jun. 2003.
- BERNIMOULIN, J.P. Recent concepts in plaque formacion. **J. Clin. Periodontol.**, v. 30, Suppl.5, p. 7-9, 2003.
- BOWDEN, G.H. Microbiology of root surface caries in humans. **J. Dent. Res.**, n. 69, p. 1205-1210, 1990.
- BUIISHI, Y. P.; AXELSSON, P. Controle mecânico do biofilme dental realizado pelo paciente. In: KRIGER, L. (coord.). **ABOPREV: promoção de saúde bucal, paradigma, ciência, humanização.** 3.ed. São Paulo: Artes médicas, 2003. cap.7. p. 121-139.
- BURNE, R. A. Oral Streptococci...products of their enviroment. **J. Dent. Res.**, v. 77, p. 445-452, 1998.
- CLELAND, R.; SQUIRS, E. **Antibiotics in laboratory medicine.** Philadelphia: Williams e Wilks, 1991. cap.3, p. 739.
- COUNCIL OF EUROPE. **Flavouring substances and natural sources of flavourings.** 3.ed. Strasbourg: Maisonneuve, 1981.

* Escrito obedecendo aos preceitos da NBR 6023/ABNT 2002.

COSTERTON, J. W. ; CHENG, K. J.; GEESEY, G. G.; LADD, T. I.; NICKEL, J. C.; DASGUPTA, M.; MARRIE, T. J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 41, p. 435-64, 1987.

CURY, J. A. Controle químico da placa. In: KRIGER, L. (coord.). **ABOPREV**: promoção de saúde bucal, paradigma, ciência, humanização. 3.ed. São Paulo: Artes médicas, 2003.cap.8. p.141-151.

CURY, J. A.; FRANCISCO, S. B.; DEL BEL CURY, A. A.; TABCHOURY, C. P. M. Relação entre exposição à sacarose, estreptococos do grupo mutans na placa dental e cárie dental- estudo *in situ*. **Braz. Dent. J.**, v. 12, n. 2, p. 101-104, 2001.

CURY, J. A.; ROCHA, E. P.; FRANCISCO, S. B.; KOO, H.; DEL BEL CURY, A. A. Effect of saccharin on antibacterial of chlorhexidine gel. **Braz. Dent. J.**, v. 11, n. 1, p. 29-34, 2000.

DEL BEL CURY, A. A.; REBELO, M. A. B.; CURY, J. A. Efeito de um bochecho contendo clorexidina/ flúor na redução de placa e incorporação de flúor no esmalte. **Rev. Bras. Odont.**, v. 51, n. 3, p. 26- 29, 1994.

De LORENZO, J. L. **Microbiologia para o estudante de odontologia**. São Paulo: Atheneu, 2004. 274p.

DENTON, G.W. Chlorhexidine. In: BLOCK, S. S. **Disinfection, Sterillization, and Preservation**. 4ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1991.cap.16.

DE PASQUALE, A. Pharmacognosy: the oldest modern science. **J. Ethnopharmacol.**, v. 11, p. 1-16

DOLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n.9, p. 881-890, set. 2002.

DURAKOVIC, Z.; DURAKOVIC, S. **J. Indian Med. Assoc.**, v. 72, n. 175, 1979.

EDGAR, W. M.; HIGHAM, S. M.; MANNING, R. H. Saliva stimulation and caries prevention. **Adv. Dent. Res.**, v. 8, n. 2, p. 239-45, 1994.

FETROW, C. W.; AVILA, J. R. **Manual de medicina alternativa para o profissional**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2000, p.743.

FINE, D.H.; FURGANG, D.; BARNETT, M.L. Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses aginst isogenic planktonic and biofilm forms of Actinobacillus actinomycetemcomitans. **J. Clin. Periodontol** 2000., v. 28, p. 697-700, 2001.

GEBARA, E.C.E.; ZARDETTO, C.G.D.C.; MAYER, M.P.A. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v. 10, n. 4, p. 251-256, out./dez. 1996.

GONÇALVES, R. B.; FLORIO, F. M. Ecologia microbiana da cavidade bucal. In:_____. **Odontologia em saúde coletiva**: planejando ações e promovendo saúde. Porto Alegre: Artmed, 2003. cap. 12.

- GUGGENHEIM, B. et al. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. **J Dent Res.**, v. 80, n. 1, p. 363-370, 2001.
- GUSTAFSSON, B. E.; QUENSEL, C. E.; SWENANDER, L. L.; LUNDQUIST, C.; GRAHNEN, H.; BONOW, B. E.; KRASSE, B. The Vipeholm dental caries study. The effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years (Sweden). **Acta Odontol. Scand.**, v. 11, p. 232-364, 1954.
- HARRIS, R. Biology of the children of Hopwood House, Bowral, Australia. Observations on dental-caries experience extending over five years (1957-1961). **J. Dent. Res.**, v. 42, p. 1387-1399, 1963.
- IACONO, V. J.; ALDREDGE, W. A.; LUCKS, H.; SCHWARTZSTEIN, S. Modern supragingival plaque control. **Int. Dent. J.**, v. 48, n. 3, Suppl. 1, p. 290-7, 1998.
- JORGE, A. O. C. **Microbiologia bucal**. 2ed. São Paulo: Santos, 1998.
- KOLENBRAND, P.E. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 54, p. 413-437, 2000.
- KOO, H.; GOMES, B.P.F.A.; ROSALEN, P.L.; AMBROSANO, G. M. B.; PARK, Y. K.; CURY, J. A. In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens. **Arch. Oral Biol.**, v. 45, p. 141-148, 2000.
- MARSH, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology**, v. 149, p. 279-294, 2002.
- MARSH, P. D. Microbiological aspect of the chemical control of plaque and gingivitis. **J. Dent. Res.**, v. 71, p. 1431-1438, 1992.
- MARSH, P. D. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. **Dent. Clin. North Am.**, v. 43, p. 599-614, 1999.
- MARSH, P.; MARTIN, M. V. **Oral microbiology**. 4ed. Boston: Wright, 2001.
- MATOS, F. J. A. Living pharmacies: Ciência e cultura. **J. Braz. Assoc. Advanc. Scien.**, v. 49, n. 5/6, p. 409-412, 1997.
- MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas**: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 4 ed. Fortaleza: UFC, 2002. 54p.
- Mc CALEB, R. **Herb safety report**. Herb Research Foundation, v. 25, 1993.
- NEWALL, C. A.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. **Plantas medicinais**: guia para profissional de saúde. São Paulo: Premier, 2002. p. 18-20.
- NEWBRUN, E. Sugar and dental caries. A review of human studies science, v. 217, p. 418-423, 1982.

OFFORD, E.; MACÉ, K.; RUFFIEUX, C.; MALNOË, A.; PFEIFER, A. M. Mechanism involved in the chemoprotective effects of rosemary extract studied in human liver and bronchial cells. **Cancer Lett.**, v. 114, p. 275-81, 1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Pautas para la evaluación de medicamentos herbários. Ginebra, 1991.

PARNHAM, M.J.; KESSELRING, K. Rosmarinic acid. **Drugs Future**, v.1, p. 756-7, 1985.

PINTO, V. G. **Saúde bucal coletiva**. 4.ed. São Paulo: Santos, 2000. 541p.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, n. 39, p. 603-613, 2001.

ROSAN, B.; LAMONT, R. J. Dental plaque formation. **Microbes and Infect.**, v. 2, p. 1599-1607, 2000.

SBORDONE, L.; BORTOLAIA, C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. **Clin. Oral Invest.**, v. 7, p. 181-188, 2003.

SCHOU, L. Behavioral aspects of dental plaque control measures: an oral health promotion perspective. In: LANG, N. P.; ATTSTRÖM, R.; LÖE, H. **Proceedings of the European Workshop on mechanical plaque control**. Berlin: Quintessenz, 1998.

SCHEIE, A.A.; PETERSEN, F.C. The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral diseases? **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.**, v. 15, n. 1, p. 4-12, 2004.

SCHEININ, A.; MAKINEN, K.K.; YLITALO, K. Turku sugar studies. Final report on the effect of sucrose, fructose and xylitol diets on the caries incidence in man. **Acta Odontol Scand.**, v. 34, p. 179-216, 1976.

SHEIHAM, A. Dietary effects on dental diseases. **Public Health Nutr.**, v. 4, p. 569-591, 2001.

STEPHAN, R. M. Changes in hydrogen-ion concentration on tooth surfaces and in caries lesions. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 27, p. 718-723, 1940.

STEPHAN, R.M. Intra-oral hydrogen-ion concentration associated with dental caries lesions. **J. Dent. Res.**, v. 23, p. 251-266, 1944.

TAKARADA, K.; KIMIZUKA, R.; TAKAHASHI, N.; HONMA, K.; OKUDA, K.; KATO, T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 19, p. 61-64, 2004.

THROWER, Y.; PINNEY, R. J.; WILSON, M. Susceptibilities of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilms to oral antiseptics. **J. Med. Microbiol.**, v. 46, n. 5, p. 425-9, 1997.

TISSERAND, R.; BALACS, T. **Essencial oil safety**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995.

UZEDA, M. **Microbiologia Oral**: etiologia da cárie, doença periodontal e infecções endodônticas. Rio de Janeiro: Medsi, 2002. 104p.

WILSON, M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobials. **J. Med. Microbiol.**, v. 44, n. 2, p. 79-87, 1996

ZERO, D. T. Sugars- The arch criminal? **Caries Res.**, v. 38, p. 277-285, 2004.

Ata da 43ª Defesa de Dissertação do Curso de Mestrado em Odontologia do Departamento de Prótese e Cirurgia Buco- Facial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 22 de março de 2005.

Às 13:30 (treze horas e trinta minutos) do dia 22 do mês de março do ano de dois mil e cinco, reuniram-se na sala "A" do Curso de Pós Graduação em Odontologia do Departamento de Prótese e Cirurgia Buco-Facial da UFPE, os membros da Banca Examinadora, composta pelos professores: Prof. Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto-UFPE, (presidente), Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio da UFPB, atuando como primeiro examinador, Profa. Dra. Ivone Antonia de Souza - UFPE, atuando como segundo examinador, para julgar o trabalho intitulado " **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DO EXTRATO HIDROALCOOLICO DE ALECRIM SOBRE BACTERIAS ORAIS PLANCTONICAS E ORGANIZADAS EM BIOFILME** ", da CD MANOELA DE SOUZA ARAUJO SILVA, candidata ao Grau de Mestre em Odontologia, na Área de Concentração em CLINICA INTEGRADA, sob orientação da Profa. Dra. ALESSANDRA ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO e co-orientação da Profª Dra. MARIA DO SOCORRO VIEIRA PEREIRA da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos o senhor Vice - Coordenador Prof. Dr. CARLOS MENEZES AGUIAR convidou os senhores membros para compor a Banca Examinadora, em seguida foram entregues aos presentes cópias do Regimento Interno do Curso de Mestrado em Odontologia, que trata dos critérios de avaliação para julgamento da Dissertação de Mestrado. O presidente da mesa após tomar posse dos trabalhos e conferir os membros convidou a mestranda, MANOELA DE SOUZA ARAUJO SILVA, para expor sobre o aludido tema, tendo sido concedido trinta minutos. A candidata expôs o trabalho e em seguida colocou-se a disposição dos Examinadores para arguição. Após o término da arguição os Examinadores se reuniram em secreto para deliberações formais. Ao término da discussão, atribuíram a candidata os seguintes conceitos: Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio (**Aprovada**), Profa. Da. Ivone Antonia de Souza (**Aprovada**), Prof. Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto (**Aprovada**) a candidata recebeu três conceitos (**Aprovada**) é considerada (**Aprovada**), devendo a candidata acatar as sugestões da Banca Examinadora de acordo com o Regimento Interno do Curso. Face a aprovação, fica a candidata, apta a receber o Grau de Mestre em Odontologia, cabendo a UFPE através de sua Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós

Confere com o original
Em 23/05/2005
Oziclete Sena de Araújo
Secretária do Programa de Pós
Graduação em Odontologia
RIAPE - 11333995

Graduação, tomar as providências cabíveis para os devidos fins. Nada mais havendo a tratar, o Senhor Presidente da Banca Examinadora encerrou a sessão e para constar eu, Oziclere Sena de Araújo Silva, lavrei a presente Ata que vai por mim assinada, pelos demais componentes da Banca Examinadora e pela recém formada mestre pela UFPE, **MANOELA DE SOUZA ARAUJO SILVA.** *Manoela de S. Araújo Silva*

Oziclere Sena de Araújo Silva

Recife, 22 de março de 2005.

Geraldo Bosco Lindoso Couto

Prof. Dr. GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO - UFPE

Presidente,

Fábio Correia Sampaio

Prof. Dr. FÁBIO CORREIA SAMPAIO - UFPB

1º Examinador

Ivone Antonia de Souza

Profa. Dra. IVONE ANTONIA DE SOUZA - UFPE

2º Examinador

Silva, Manoela de Souza Araújo

Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico de alecrim (*Rosmarinus officinalis* Linn.) sobre bactérias orais planctônicas / Manoela de Souza Araújo Silva. – Recife : O Autor, 2005.

41 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Odontologia, 2005.

Inclui bibliografia.

1. Odontologia – Odontologia preventiva. 2. *Rosmarinus officinalis* Linn. (Alecrim) – Atividade antimicrobiana – Bactérias orais. 3. Alecrim – Concentração inibitória mínima (CIM) – Concentração inibitória mínima de aderência (CIMA). I. Título.

**616.314-084
616.601**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
BC2005-305**