

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Isabela Moreira Baumgratz de Paula

**DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DA  
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Rosmarinus officinalis* Linn  
AVALIANDO O POTENCIAL PARA PREPARAÇÃO DE  
ENXAGUATÓRIO BUCAL**

Juiz de Fora

2013

**ISABELA MOREIRA BAUMGRATZ DE PAULA**

**DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DA ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA DE *Rosmarinus officinalis* Linn AVALIANDO O  
POTENCIAL PARA PREPARAÇÃO DE ENXAGUATÓRIO BUCAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Celia Hitomi Yamamoto

JUIZ DE FORA

2013

**ISABELA MOREIRA BAUMGRATZ DE PAULA**

**DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DA ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA DE *Rosmarinus officinalis* Linn AVALIANDO O  
POTENCIAL PARA PREPARAÇÃO DE ENXAGUATÓRIO BUCAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Celia Hitomi Yamamoto – Orientadora  
Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Profa. Dra. Irene Satiko Kikuchi  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo

---

Profa. Dra. Maria da Penha Henriques do Amaral  
Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Profa. Dra. Míriam Aparecida de Oliveira Pinto - Suplente  
Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço - Suplente  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo

*“À minha mãe pelo apoio, amor incondicional, carinho e sacrifício que sempre fez pela minha formação profissional.*

*À vovó Flausina, exemplo de vida.*

*Aos meus tios Carlos Alberto e Shirley, que mesmo de longe me ajudaram na caminhada.”*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por que sem Ele nada disso seria possível.

À minha família, minha mãe, por me apoiar o tempo todo, ajudando a alcançar meus sonhos e objetivos.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora, por proporcionar a difusão do conhecimento científico.

A minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Célia Hitomi Yamamoto, pelo conhecimento, atenção e disponibilidade com qual fui acolhida e orientada. Minha sincera gratidão!

Aos meus amigos, Kamilla Coelho, Carolina Gasparetto, Antônio Vinícius, Érika Suzuki e Gustavo Bellei, pelo conhecimento compartilhado, incentivo e companheirismo. Em especial à Erika Maria Henriques Monteiro, que não mediu esforços para auxiliar no desenvolvimento da parte experimental.

Ao Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa, responsável pelo Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais, pelo apoio na realização dos ensaios fitoquímicos.

Às colegas do laboratório de Controle de Qualidade, Flávia Moraes, Vaneida Maria Meurer, Daniela Guillarducci e Sandra Olivia pela ajuda e atenção.

Aos funcionários da Faculdade de Farmácia Jésus, Carlos, Nádia e Maura, pela atenção e solicitude.

À Fundação Oswaldo Cruz pela doação das cepas microbianas.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro ao longo do curso.

E a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, ajudaram na execução desse trabalho.

## RESUMO

*Rosmarinus officinalis*, pertencente à família *Lamiaceae*, é um exemplar da flora medicinal que possui propriedades terapêuticas atribuídas ao sinergismo de seus constituintes químicos. Destacam-se as atividades anti-hipertensiva, digestiva, hipoglicemiante, inibidor das enzimas acetilcolinesterase e  $\alpha$ -amilase e antimicrobiana contra fungos e bactérias. As características biológicas do extrato de *R. officinalis* têm sido amplamente estudadas, resultando na comprovação da eficácia inibitória em relação à microbiota bucal. Neste trabalho objetivou-se desenvolver um fitoterápico de solução enxaguatória bucal contendo o extrato da planta, avaliando sua eficácia antimicrobiana. Foram realizados os testes de determinação de teor de fenóis e flavonóides nos extratos de *R. officinalis* por métodos espectrofotométricos. A ação antiaderente foi avaliada através da Concentração Inibitória Mínima de Aderência. Formularam-se soluções contendo Benzoato de Sódio, Sacarina, Propilenoglicol, EDTA dissódico e Óleo essencial de menta. As concentrações dos extratos testadas foram 0,1; 5 e 10% de extrato etanólico de *R. officinalis* e 0,05; 5 e 10% da fração hexânica de *R. officinalis*. Para avaliar o sinergismo, o extrato etanólico e a fração hexânica também foram adicionados à formulações que continham Fluoreto de Sódio 0,05% e Digluconato de Clorexidina 0,12%. Como branco foi utilizada a formulação do enxaguatório sem adição do extrato e como controle a Clorexidina a 0,12%. Nestas formulações avaliou-se a capacidade inibitória frente a *S. mutans* (ATCC 25175) e *C. albicans* (ATCC 10231), empregando o método de difusão em ágar. Os resultados mostraram presença da atividade antimicrobiana contra *S. mutans* e *C. albicans* em todas as concentrações de extrato da planta. A menor concentração que impediu a aderência do *S. mutans* foi 6,25 mg/mL. Dentre as soluções testadas, apresentou maior sensibilidade o *S. mutans* frente à solução enxaguatória com extrato etanólico 5% e fluoreto de sódio 0,05% e à solução enxaguatória com fração hexânica a 10% frente à *C. albicans*. Portanto, a formulação do enxaguatório bucal proposta neste trabalho mostrou ter potencial antimicrobiano.

Palavras-chave: *Rosmarinus officinalis*. Atividade antimicrobiana. Atividade antiaderente. Enxaguatório bucal. Saúde bucal.

## ABSTRACT

*Rosmarinus officinalis*, which belongs to the *Lamiaceae* family, is a pattern of medicinal flora that has therapeutic properties attributed to the synergism of its chemical constituents. It is highlighted its activities in antihypertensive, digestive, hypoglycemic, enzyme acetylcholinesterase inhibitor and  $\alpha$ -amylase and antimicrobial against fungi and bacteria. The biological characteristics of the extract of *R. officinalis* have been extensively researched, resulting in the confirmation of its inhibitory efficacy compared to oral microbiota. The objective of this research was to develop an herbal mouthwash solution containing the plant extract, evaluating its antimicrobial efficacy. Tests were performed to determine total phenol and flavonoid in extracts of *R. officinalis*, by spectrophotometric methods. The nonstick action was evaluated by Minimum Inhibitory Concentration of Adherence. Solutions containing sodium benzoate, saccharine, propylene glycol, disodium EDTA and mint essential oil were formulated. Concentrations for the extracts tested were 0.1, 5 and 10% of the ethanol extract of *R. officinalis*; and 0.05, 5 and 10% of the hexane fraction of *R. officinalis*. In order to evaluate the synergism, ethanol extract and hexane fraction were also added to formulations containing 0.05% Sodium Fluoride and 0.12% Chlorhexidine Diguclonato. As a white control was used mouthwash formulation without the addition of the *R. officinalis* extract, and as positive control the 0.12% Chlorhexidine. In these formulations was assessed the inhibitory effect against *S. mutans* (ATCC 25175) and *C. albicans* (ATCC 10231), using the agar diffusion method. Results revealed the presence of antimicrobial activity against *S. Mutans* and *C. albicans* in all concentrations of plant extract. The lowest concentration that prevented the adherence of *S. mutans* was 6.25 mg/mL. Among the solutions tested, it was observed a higher sensitivity of *S. mutans* in the presence of mouthwash solution with 5% ethanol extract and 0.05% sodium fluoride, and in the presence of the mouthwash solution with hexane fraction at 10% tested wuth to *C. albicans*. Therefore, the formulation of the mouthwash proposed in this research has shown antimicrobial activity.

Keywords: *Rosmarinus officinalis*. Antimicrobial Activity. Adherent activity. Mouthwash solution. Oral health.

## LISTA DE FIGURAS

		P.
Figura 1	Estrutura básica dos flavonóides.....	22
Figura 2	Fotografia da planta <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	24
Figura 3	Esquema de extração e fracionamento da amostra.....	39
Figura 4	Esquema de diluições sucessivas nos poços.....	44
Figura 5	Varredura espectrofotométrica do ácido gálico .....	48
Figura 6	Curva de calibração do ácido gálico .....	49
Figura 7	Varredura espectrofotométrica da rutina.....	50
Figura 8	Curva de calibração da rutina.....	50
Figura 9	Halo formado pela inibição do crescimento do <i>S. mutans</i> ATCC 25175 pelo extrato etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> a 10%....	53
Figura 10	Halo formado pela inibição do crescimento do <i>S. mutans</i> ATCC 25175 pela fração em diclorometano de <i>Rosmarinus officinalis</i> a 10%.....	53
Figura 11	Halo formado pela inibição do crescimento da <i>C. albicans</i> ATCC 10231 pela fração em diclorometano de <i>Rosmarinus officinalis</i> a 5%.....	55
Figura 12	Halo formado pela inibição do crescimento da <i>C. albicans</i> ATCC 10231 pela fração hexânica de <i>Rosmarinus officinalis</i> a 5%.....	55
Figura 13	Controle positivo do teste de CIMA para o <i>S. mutans</i> ATCC 25175.....	60
Figura 14	Teste de CIMA frente à <i>S. mutans</i> ATCC 25175, para a fração em Butanol de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	60
Figura 15	Teste de CIMA frente à <i>S. mutans</i> ATCC 25175, para a Clorexidina.....	61
Figura 16	Halo formado pela inibição do crescimento do <i>S. mutans</i> ATCC 25175, pelo enxaguatório bucal com extrato etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> a 0,1% e Clorexidina a 0,12%.....	66



Figura 17	Halo formado pela inibição do crescimento da <i>C. ATCC 10231</i> , pelo enxaguatório bucal com extrato etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> a 0,1% e Fluoreto de Sódio a 0,05%.....	66
Figura 18	Halo formado pela inibição do crescimento da <i>S. mutans</i> ATCC 5425175, pelo enxaguatório bucal com a fração hexânica de <i>Rosmarinus officinalis</i> a 0,05%.....	68
Figura 19	Halo formado pela inibição do crescimento da <i>C. albicans</i> ATCC 10231, pelo enxaguatório bucal com a fração hexânica de <i>Rosmarinus officinalis</i> a 0,05% e Fluoreto de Sódio a 0,05%.	68
Figura 20	Fotografia da formulação do enxaguatório bucal .....	69

## LISTA DE TABELAS

	P.
Tabela 1	Classificação Botânica de <i>R. officinalis</i> ..... 26
Tabela 2	Lotes e fornecedores das matérias primas das utilizadas nas formulações..... 45
Tabela 3	Formulação do enxaguatório bucal com extrato etanólico de <i>R. officinalis</i> ..... 46
Tabela 4	Formulação do enxaguatório bucal com fração hexânica de <i>R. officinalis</i> ..... 47
Tabela 5	Teores de fenóis e flavonoides totais de <i>R. officinalis</i> ..... 51
Tabela 6	Resultado do teste de difusão em ágar para o extrato e frações de <i>R. officinalis</i> a 5 e 10%, frente à <i>S. mutans</i> ATCC 25175..... 52
Tabela 7	Resultado do teste de difusão em ágar para o extrato e frações de <i>R. officinalis</i> a 5 e 10%, frente à <i>C. albicans</i> ATCC 10231..... 54
Tabela 8	Resultado do teste Concentração Inibitória Mínima..... 57
Tabela 9	Resultado do teste Concentração Inibitória Mínima de Aderência. 59
Tabela 10	Resultado do teste de difusão em ágar para os enxaguatórios com extrato etanólico de <i>R. officinalis</i> ..... 65
Tabela 11	Resultado do teste de difusão em ágar para os enxaguatórios com fração hexânica de <i>R. officinalis</i> ..... 67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Percentual
ATCC	American Type Culture Collection
C+	Controle positivo
C-	Controle negativo
CESJ	Herbário Leopoldo Krieger
CIM	Concentração Mínima Inibitória
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
°C	Graus Celsius
CIMA	Concentração Inibitória Mínima de Aderência
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
mL	Mililitros
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina
n°	Número
pH	Potencial de Hidrogênio Iônico
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
SUS	Sistema Único de Saúde
µg	Microgramas
µL	Microlitros
q.s.p.	quantidade suficiente para
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
USDA	United States Department of Agriculture

## SUMÁRIO

	P.
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
<b>2.1</b> CARACTERIZAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DOS FITOTERÁPICOS .....	16
<b>2.2</b> BIOCOMPOSTOS DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE PLANTAS.....	19
<b>2.2.1</b> CONSTITUINTES FENÓLICOS.....	20
<b>2.2.2</b> FLAVONÓIDES.....	21
<b>2.3</b> ASPECTOS GERAIS DAS PLANTAS DA FAMÍLIA <i>Lamiaceae</i> .....	23
<b>2.4</b> <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	23
<b>2.4.1</b> CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA.....	25
<b>2.4.2</b> HABITAT E CULTIVO.....	26
<b>2.5</b> ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PLANTAS E DERIVADOS DE <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	27
<b>2.6</b> CÁRIE DENTÁRIA.....	30
<b>2.6.1</b> BIOFILME DENTAL.....	31
<b>2.6.2</b> PLACA DENTÁRIA.....	32
<b>2.7</b> ENXAGUATÓRIOS BUCAIS E PLANTAS MEDICINAIS.....	33
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	37
<b>3.1</b> OBJETIVO GERAL.....	37
<b>3.2</b> OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
<b>4. MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	38
<b>4.1</b> COLETA DE FOLHAS DE <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	38
<b>4.2</b> PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO .....	38
<b>4.3</b> DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FENÓIS E FLAVONÓIDES TOTAIS .....	39
<b>4.3.1.</b> FENÓIS.....	39
<b>4.3.2.</b> FLAVONÓIDES.....	40
<b>4.4</b> CEPAS DE MICRO-ORGANISMO PADRÃO EMPREGADO NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	41
<b>4.5</b> PREPARO DA SUSPENSÃO PADRONIZADA DAS CEPAS DOS MICRO-ORGANISMOS PADRÕES .....	41

4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM MEIO DE CULTURA SÓLIDO POR TÉCNICA DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....	42
4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DO EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	42
4.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ADERÊNCIA (CIMA) DO <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 A UMA SUPERFÍCIE.....	44
4.9 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO DE ENXAGUATÓRIO BUCAL CONTENDO EXTRATO DE <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	45
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	48
5.1 TEORES DE FENÓIS E FLAVONÓIDES TOTAIS.....	48
5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM MEIO DE CULTURA SÓLIDO POR TÉCNICA DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....	52
5.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DO EXTRATO E FRAÇÕES DE <i>R. OFFICINALIS</i> FRENTE A <i>S. mutans</i> ATCC 25175 E <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	56
5.4 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ADERÊNCIA (CIMA) DO <i>S. mutans</i> ATCC 25175 A UMA SUPERFÍCIE.....	58
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ENXAGUATÓRIO BUCAL CONTENDO <i>Rosmarinus officinalis</i> PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....	62
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	71
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	72
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	73

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais constituem importante recurso terapêutico no tratamento de doenças que afetam a saúde humana, principalmente em países emergentes ou em desenvolvimento, sendo parte da sua cultura popular. Constituem fonte de matéria-prima para elaboração de medicamentos fitoterápicos ou, de extração de compostos químicos, farmacologicamente ativos (FREITAS, 2000; JUNIOR, et al., 2005).

Fitoterápico, de acordo com a definição constante na legislação sanitária brasileira, é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas de origem vegetal. Deve apresentar, características como eficácia e conhecimento dos riscos de seu uso, assim como reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2004). No entanto, muitos fatores como a grande variedade de espécies vegetais, a desinformação sobre o uso terapêutico das plantas e o limitado desenvolvimento tecnológico para a produção de fitoterápicos, podem comprometer a eficácia e a segurança dos produtos.

A partir do final da década de 1990 ocorreu um aumento significativo de trabalhos de pesquisa relacionados ao estudo da atividade biológica com extratos de plantas (NASCIMENTO et al., 2005; ALVARENGA et al., 2007; ZANIN et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2010; BARBOSA et al., 2012). A maioria dos estudos são testes isolados com uma ou poucas espécies, geralmente baseados em informações etnofarmacológicas (PEREIRA et al., 2004; LOGUERCIO et al., 2005).

A propriedade antimicrobiana de substâncias e óleos essenciais contidas em plantas como produtos de seu metabolismo especial tem sido reconhecida empiricamente até o momento presente, sendo confirmada cientificamente. Vários grupos de pesquisadores estudam a atividade biológica de plantas medicinais originárias de diversas regiões do mundo, orientados pelo uso popular das espécies nativas (NEWALL et al., 2002; SOUSA et al., 2007; ALVES et al., 2009; ROSA et al., 2010).

Um amplo estudo pode ser mais efetivo se a investigação abranger o potencial farmacológico de várias espécies de um determinado gênero guiado pelo uso medicinal popular. Em virtude da biodiversidade presente nos diferentes biomas brasileiros, existe uma crescente demanda para produtos naturais por indústrias farmacêuticas nacionais e internacionais, que impulsiona as investigações científicas e a busca por drogas naturais (DUARTE, 2006; SHAN et al., 2007).

Muitas espécies microbianas apresentam resistência à maioria das substâncias antimicrobianas, podendo causar sérios prejuízos à saúde humana. Incentivo para o

desenvolvimento de moléculas inéditas a partir de fontes naturais, para obter novos antibióticos constitui grande avanço para terapias anti-infecciosas (SOUZA e CONCEIÇÃO, 2007).

*Rosmarinus officinalis*, conhecido popularmente como alecrim, pertence à família *Lamiaceae*, e por possuir potentes propriedades farmacológicas tem sido utilizado como digestivo, anti-hipertensivo, hipoglicemiante, inibidor das enzimas acetilcolinesterase e  $\alpha$ -amilase, além de possuir atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias (PORTE e GODOY, 2001). Estudos realizados confirmam a presença da ação antimicrobiana e corroboram o uso dessa planta no tratamento e prevenção de afecções causadas por bactérias (CORDEIRO et al., 2006; SOUZA e CONCEIÇÃO, 2007; TRESSINO e GABRIEL, 2009; SILVA et al., 2008).

A eficácia de plantas medicinais, como componentes tanto nos géis dentifrícios, como nos enxaguatórios bucais, tem sido investigada para o tratamento de doenças periodontais. Os resultados sugerem que os ingredientes de origem vegetal podem ser empregados como apoio à terapia das doenças periodontais e como profilaxia de rotina (FIGUEREDO et al., 2002).

Nesse contexto, este trabalho propõe a formulação de um enxaguatório bucal com extrato de *Rosmarinus officinalis*, corroborando que a utilização de produtos fitoterápicos é economicamente viável, mostrando-se como uma alternativa interessante e contribuindo para melhorar o acesso da população aos cuidados com a prevenção e tratamento de doenças periodontais (CORDEIRO et al., 2006).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CARACTERIZAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DOS FITOTERÁPICOS

Comparada a diversos países no mundo, a flora brasileira ainda pouco explorada, apresenta uma imensa diversidade de espécies vegetais em função dos seus diferentes ecossistemas. Esta biodiversidade fornece um recurso precioso à ciência da saúde, possibilitando o desenvolvimento de novos recursos terapêuticos à população. Muitas plantas conhecidas popularmente são usadas na medicina popular, dentre as quais, espécies com atividade terapêutica comprovada para o tratamento das infecções bacterianas. No entanto, devido ao desconhecimento da possível existência da ação tóxica, bem como de sua indicação adequada, as plantas medicinais são muitas vezes usadas de forma incorreta, não produzindo o efeito desejado (PEREIRA et al.,2004).

Para avaliar a segurança de um medicamento fitoterápico, deve-se considerar o tempo de uso deste medicamento. Não havendo estudos toxicológicos detalhados, é recomendável considerar o uso tradicional como base na avaliação de risco, desde que não haja evidências de problemas de segurança. Por isto, faz-se necessária uma revisão da literatura a fim de se verificar se as informações de segurança estão bem estabelecidas (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

É importante ressaltar que, mesmo que uma planta medicinal venha sendo utilizada há muito tempo, problemas toxicológicos crônicos podem ter ocorrido sem que tenham sido documentados. Caso não existam dados bem esclarecidos, tornam-se necessários os estudos clínicos, que irão avaliar as toxicidades agudas oral, dérmica, inalatória e por doses repetidas (WHO, 2000).

No início da década de 90, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65 a 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde. Entretanto, pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos fiscalizadores em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (SOUZA e CONCEIÇÃO, 2007; SOUZA, 2010).

Muitas plantas dos biomas brasileiros, tais como o cerrado, a floresta amazônica e a Mata Atlântica têm sido utilizadas como fármacos naturais pelas populações locais no tratamento de várias doenças tropicais, incluindo esquistossomose, leishmaniose, malária e



infecções fúngicas e bacterianas (GABRIEL & TRESSINO, 2009). Além disso, muitas plantas exóticas foram introduzidas no Brasil desde a colonização e incorporadas na medicina popular (DUARTE, 2006).

Segundo Yunes e Calixto (2001) a indústria farmacêutica busca novos fármacos com potencial agente terapêutico. A síntese de novas substâncias a serem bioensaiadas, na busca por fármacos novos, passou a ser dispendiosa, visto o pequeno número de novos compostos que venciam as etapas pré-clínicas e clínicas, chegando ao mercado como medicamentos. Neste novo cenário, a indústria farmacêutica passou a investir pesadamente em novos métodos de pesquisa de novas entidades químicas bioativas, com efetiva potência terapêutica. A biologia molecular e as novas técnicas genéticas permitiram o isolamento e a purificação de muitas enzimas, receptores diretamente associados a processos patológicos, representando autênticos alvos-moleculares para novos fármacos (VIEGAS JR. et al., 2006). Estes progressos permitiram a adoção de sistemas de testes em batelada, possibilitando que milhares de novas substâncias obtidas, geralmente, por química combinatória, pudessem ser avaliados *in vitro* (SHU et al., 1998). Esta nova abordagem promoveu uma autêntica revolução na forma de concepção da síntese orgânica praticada, até então, na indústria farmacêutica (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Neste contexto, os produtos naturais vêm recuperando espaço e importância na indústria farmacêutica, como fonte inspiradora de novos padrões moleculares bioativos. Na Europa, a fitoterapia já é parte da medicina tradicional, sendo que extratos de plantas e componentes ativos, além de produtos medicinais acabados, estão descritos em muitas farmacopeias. Exemplos marcantes da importância da fitoterapia de origem oriental são os extratos de ginseng e de *Hypericum*, o fitoterápico TMPZ-2 obtido do extrato de *Ligusticum chuanxiong*, utilizado no tratamento da angina (YUNES et al., 2001). O Ginkgo biloba utilizado no controle de problemas vasculares cerebrais, de memória e com propriedades neuroprotetoras ilustra um exemplo de fitoterápico de sucesso (GOLD et al., 2002). Do extrato da erva-de-São-João (*Hypericum perforatum*), foi isolada a hipericina, utilizada como antidepressivo (KATHAWALA, 1984; ROTH et al., 1989).

Na literatura são descritas diversas plantas com propriedades medicinais, dentre as quais, espécies pertencentes à família Lamiaceae, composta por aproximadamente 252 gêneros incluindo *Melissa officinalis* (erva-cidreira), *Ocimum basilicum* L. (alfavaca), *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) apresentando propriedades estimulantes, antiespasmódicas, anti-sépticas, antifúngicas e antibacterianas (PORTE e GODOY, 2001).

No Brasil, o órgão responsável pela regulamentação de plantas medicinais e seus derivados é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), autarquia do Ministério da Saúde que tem como papel proteger e promover a saúde da população garantindo a segurança sanitária de produtos e serviços e participando da construção de seu acesso (BRASIL, 1999). Uma das ações realizadas pela ANVISA para garantir a segurança da saúde da população é o registro de medicamentos, etapa na qual os mesmos são avaliados quanto a sua segurança, eficácia e qualidade antes de serem expostos a venda para utilização pela população.

O registro de fitoterápicos segue o disposto na Lei nº 6.360/73 regulamentado pelo Decreto nº 79.094/77. Tem como regulamentos específicos a Resolução - RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) nº 48/04, complementada pelas seguintes: Resolução - RE nº 88/04 (Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia), Resolução - RE nº 89 (Lista de registro simplificado), Resolução - RE nº 90/04 (Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica) e Resolução - RE nº 91/04 (Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós-registro) (BRASIL, 2013).

A RDC nº48/2004 determina os aspectos essenciais ao registro, como identificação botânica das espécies vegetais utilizadas, padrão de qualidade e identidade e provas de eficácia e segurança que validem as indicações terapêuticas propostas (BRASIL, 2004). E ainda, que todos os testes referentes ao controle de qualidade de fitoterápicos deverão ser realizados em redes credenciadas no sistema REBLAS (Rede Brasileira de Laboratório em Saúde) ou por empresas que possuam certificado de Boas Práticas de Fabricação e Controle. Dentre as exigências da Resolução, está a necessidade de controle de qualidade do produto acabado, com métodos analíticos que incluam perfis cromatográficos e comprovação de segurança de uso e estudos de toxicidade.

Esta preocupação das autoridades regulatórias com a normatização dos medicamentos fitoterápicos propicia a avaliação de aspectos importantes, como a eficácia e segurança do uso destes medicamentos. O uso tradicional de diversas plantas medicinais baseado em conhecimentos populares, aliado à crença de que, por ser natural, não causa reações adversas, fez com que poucas plantas medicinais fossem avaliadas através de estudos pré-clínicos e clínicos, a fim de comprovar sua eficácia e segurança (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). Além disto, sabe-se que muitas plantas medicinais apresentam substâncias que podem desencadear reações adversas, seja por seus próprios componentes, seja pela presença de contaminantes ou adulterantes presentes nas preparações fitoterápicas, exigindo um rigoroso

controle de qualidade desde o cultivo, coleta da planta, extração de seus constituintes, até a elaboração do medicamento final.

Encontra-se aberta a Consulta Pública de nº 14, de 14 de maio de 2013, com o título: Proposta de Instrução Normativa que determina a publicação da "Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado" e a "Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado", que visa definir a lista de fitoterápicos de registro simplificado. A lista inclui as espécies que poderão ser registradas como medicamentos fitoterápicos ou como produtos tradicionais fitoterápicos, sem a apresentação de dados adicionais de segurança e eficácia.

As espécies serão divididas de duas maneiras, entre as que possuem segurança e eficácia comprovada por estudos clínicos das que comprovam por histórico de uso pela população, as quais poderão ser enquadradas como produto tradicional fitoterápico. A lista de fitoterápicos de registro simplificado existe na ANVISA desde 2000. Essa é a quarta atualização.

A consulta trata da lista de espécies vegetais que serão enquadrados em uma das duas categorias, incluindo produtos originados da arnica, calêndula, camomila e boldo, entre outros vegetais. A norma para o registro ou notificação de medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais fitoterápicos ainda está em discussão interna na ANVISA e também será colocada em consulta pública em breve. A expectativa é que as normas de registro ou notificação e a lista final de produtos de registro simplificado sejam publicadas ao mesmo tempo, após a ANVISA finalizar a discussão.

## 2.2 BIOCÓMPUESTOS DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE PLANTAS

Os vegetais produzem uma grande variedade de compostos orgânicos, conhecidos como metabólitos secundários, que não apresentam efeitos diretos sobre processos celulares primários como fotossíntese, respiração, translocação de solutos e água, síntese de proteínas e assimilação de nutrientes. Eles diferem dos metabólitos primários (aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e lipídios) por sua distribuição específica no reino vegetal, sendo característicos de uma família de espécies relacionadas, enquanto os metabólitos primários são de ocorrência universal (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os metabólitos secundários, também chamado de especiais, protegem os vegetais contra herbívoros e patógenos. Sendo divididos em três grupos químicos principais: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (SIMÕES et al., 2007). Os terpenos (ou terpenóides) constituem o maior grupo, suas diversas classes são, em geral, insolúveis em água e sintetizadas a partir da acetil-CoA. Exemplos de terpenóides incluem as giberelinas, os carotenóides e os piretróides (ROBINSON, 1991).

Os compostos fenólicos são moléculas que contêm um grupo fenol em sua estrutura. Constituem em vegetais um grupo muito heterogêneo com mais de 10.000 compostos. A solubilidade é variável, conforme sua estrutura química. Duas vias metabólicas estão envolvidas na sua síntese: a via do ácido chiquímico e do acetato. Dentre os compostos fenólicos, destacam-se as ligninas, cumarinas, flavonóides e taninos (ROBINSON, 1991).

Os compostos nitrogenados são constituídos por uma grande variedade de metabólitos especiais contendo nitrogênio na sua estrutura. Eles incluem algumas moléculas relacionadas à defesa vegetal contra herbivoria, como os alcalóides e os glicosídeos cianogênicos. Algumas dessas moléculas são tóxicas aos humanos, sendo outras utilizadas no tratamento de doenças em função das suas propriedades medicinais. Os metabólitos secundários nitrogenados são sintetizados a partir de aminoácidos do metabolismo proteico (COSTA, 1994).

### 2.2.1 CONSTITUINTES FENÓLICOS

Constituintes fenólicos de origem natural são representados por substâncias que apresentam desde peso molecular baixo àqueles mais elevados, com estruturas mais complexas, como taninos condensados e hidrolisáveis e ligninas (CARVALHO et al., 2000). Substâncias fenólicas podem ser biossintetizadas pelas vias do ácido chiquímico, acetato, ou por ambas (via mista). Dependendo da via, o padrão de substituição na substância fenólica pode ser determinado. A via do ácido chiquímico produz substâncias com grupos hidroxilas na posição *orto*, que se formam a partir do ácido cinâmico, enquanto a via do acetato origina moléculas com hidroxilas dispostas em *meta*. O timol constitui um terpenóide fenólico sintetizado pela via acetato (ANDERSEN; MARKHAM, 2005; DEWICK, 2009).

A eles são atribuídas as propriedades de odor, sabor e coloração. Em decorrência dessas propriedades, as substâncias fenólicas, como o aldeído cinâmico e a vanilina, são empregadas nas indústrias de alimentos e bebidas como flavorizantes e corantes. Além disso, outras substâncias, tais como hidroquinona, ácido elágico e ésteres do ácido gálico, possuem

propriedades de defesa das plantas, além de participarem na interrelação entre animais e vegetais, com atividades de inibição da germinação de sementes, do crescimento de fungos e de plantas em geral. Alguns arilpropanóides também têm importante papel na supressão do apetite de insetos (VERMERRIS; NICHOLSON, 2007).

Os vegetais são ricos em substâncias antioxidantes como os constituintes fenólicos que são produtos do metabolismo secundário. Esta característica é resultado do processo evolutivo das espécies como proteção natural aos radicais livres formados pela radiação ultravioleta (UV) necessária à fotossíntese. Tais substâncias são antioxidantes primários, pois neutralizam a reatividade radicalar através da doação de um átomo de hidrogênio, bloqueando as reações em cadeia (F'GUYER et al., 2003; NIKOLIC, 2006).

Entre os constituintes fenólicos, destacam-se os flavonóides que serão descritos no item seguinte.

### 2.2.2 FLAVONÓIDES

Os flavonóides são substâncias fenólicas de baixo peso molecular e representam uma ampla classe de constituintes encontrada nos vegetais (ANDERSEN; MARKHAM, 2005; BUER et al., 2010). São encontrados em frutas, vegetais, sementes, cascas de árvores, raízes, talos, flores e em seus produtos, como os chás e os vinhos (NIJVELDT et al., 2001). Esses constituintes são conhecidos como pigmentos amarelos, sendo responsáveis pela maioria dos corantes amarelos, vermelhos e azuis presentes nas plantas (WINKEL-SHIRLEY, 2001). Por atuarem em diferentes sistemas orgânicos, diversas propriedades biológicas e farmacológicas são atribuídas a essas substâncias (NIJVELDT et al., 2001; TAPAS et al., 2008). Sabe-se que a ingestão de flavonóides interfere em diversos processos fisiológicos, e auxilia na absorção e na ação de vitaminas, por atuar nos processos de cicatrização, como antioxidantes, além de apresentarem atividade antimicrobiana (MENEZES, 2005).

Do ponto de vista químico, os flavonóides são substâncias aromáticas que contêm 15 átomos de carbono no seu núcleo fundamental (Figura 1). Este núcleo comum é caracterizado por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado (anel C) (ANDERSEN; MARKHAM, 2005; WINKEL-SHIRLEY, 2001).

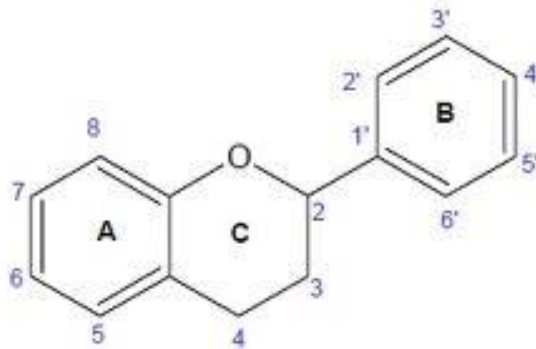


Figura 1: Estrutura básica dos flavonóides.  
Fonte: ARAÚJO et al., 2005.

A diversidade de grupos substituintes, combinada a vários padrões de hidroxilação, metilação e glicosilação que podem ocorrer nos anéis aromáticos, gera uma grande diversidade de flavonóides, compreendendo mais de 9.000 estruturas identificadas (BUER et al., 2010). A biossíntese dessas substâncias ocorre a partir da via mista do acetil-CoA e ácido chiquímico (ANDERSEN; MARKHAM, 2005; PIETTA, 2000; BUER et al., 2010). Dentre as subclasses de flavonóides destacam-se as antocianinas, antocianidinas, flavonóis, flavononas, flavonas, catequinas, flavanóis e as chalconas (ANDERSEN; MARKHAM, 2005; PIETTA, 2000; WINKEL-SHIRLEY, 2001). Como função biológica, os flavonóides protegem as plantas dos raios UV, insetos, fungos, vírus e bactérias. Também ajudam a atrair polinizadores, regulam a ação de hormônios e inibem enzimas (ANDERSEN; MARKHAM, 2005; BUER et al., 2010).

Para o organismo humano, os flavonóides possuem uma série de propriedades benéficas ao metabolismo devido a sua ação antioxidante. Devido a isso, apresenta ação na prevenção da peroxidação lipídica da membrana celular e na proteção de substâncias de importante papel fisiológico, como a vitamina C e adrenalina, do dano oxidativo (TAPAS et al., 2008). Atuam como antialérgicos, por inibirem a liberação de histamina e como anti-inflamatórios por inibirem a enzima lipoxigenase, que converte o ácido araquidônico nos mediadores da inflamação (ONWUKAEME, 1995; NIJVELDT et al., 2001; NIJVELDT et al., 2001; BUER et al., 2010). A atividade antioxidante destas substâncias pode proteger o corpo de efeitos cancerígenos e prevenir doenças crônico-degenerativas. São capazes de prevenir doenças cardiovasculares, seja pela inibição da agregação plaquetária, pela redução dos altos níveis de lipídios no sangue (triglicerídeos; colesterol), ou pela prevenção da

oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Possuem também atividades tripanomicida e leishmanicida e atividade antibacteriana e antiviral (FRANKEL et al., 1993; ARAUJO, 2005; SÜLSEN et al., 2007; HERNÁNDEZ; TERESCHUK; ABDALA, 2000).

### 2.3 ASPECTOS GERAIS DAS PLANTAS DA FAMÍLIA LAMIACEAE

A família Lamiaceae apresenta cerca de 252 gêneros, nos quais se distribuem 6700 espécies. A presença de dois lábios nas suas flores é o que mais caracteriza essa família botânica, além das folhas e do caule serem cobertos por pêlos glandulares que produzem óleo essencial (BISSET, 1994). Segundo Schardong & Cervi (2000), esta família apresenta diversos representantes tradicionalmente cultivados e originários da Europa, com finalidades medicinais, trazidos ao Brasil, provavelmente, junto à colonização e incorporados à cultura popular.

Muitas das espécies introduzidas no Brasil são plantas medicinais e produtoras de óleos essenciais, sendo utilizadas também como condimentos ou como flores ornamentais (BARROSO, 1986). Dentre os gêneros cultivados destacam-se várias espécies usadas como condimentos, entre os quais, erva-cravo (*Hyptis*), alfavaca (*Ocimum*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), hortelã-pimenta (*Mentha*), orégano (*Origanum*) e erva-cidreira (*Melissa*). Outras são cultivadas como flores ornamentais ou para produção de óleo essencial, como: salvia (*Salvia*) e alfazema (*Lavandula*) (JOLY, 1993; DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

Trotter e Logan (1986) comentaram que as espécies de plantas ricas em óleo essencial, como as da família Lamiaceae, são culturalmente muito importantes quanto ao seu uso, destacando-se o *Rosmarinus officinalis* (alecrim), que é uma planta originária da região mediterrânea da Europa. É cultivada em quase todo o território brasileiro, e também importada como condimento para o consumo interno. Estudos têm sido realizados sobre esta importante planta medicinal (PORTE & GODOY, 2001; FUNDAÇÃO ZOOBOTÂNICA DO RIO GRANDE DO SUL, 2005).

#### 2.4 *Rosmarinus officinalis*

O alecrim é um arbusto aromático de pequeno porte (Figura 2) cujas folhas abrigam pequenas glândulas contendo óleo aromático (PORTE & GODOY, 2001).

Dentre as principais características, citam-se folhas lineares coriáceas, de cor verde, forma tubular de aroma forte e característico, sendo arbusto perene de porte (1,5 metros) (JOLY, 1993; SOUZA e CONCEIÇÃO, 2007).

O seu nome, *Rosmarinus*, está ligado ao seu hábitat: *ros marinus* - rócio do mar, (orvalho do mar) (GIUGNOLININI, 1985; PINTORE et al., 2002).



Figura 2: Fotografia da planta *Rosmarinus officinalis* (alecrim), cultivada no Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Farmácia – UFJF.

Seu óleo essencial é constituído por hidrocarbonetos monoterpênicos, ésteres terpênicos, linalol, verbinol, terpineol, 3-octanona e acetato de isobornila, dentre outros compostos (ALONSO JUNIOR, 1998). Sua composição química pode apresentar variações devido a fatores ambientais e do manejo das plantas, bem como da forma de extração e armazenamento, interferindo em sua atividade antimicrobiana (NASCIMENTO et al., 2007).

Em estudo realizado por Ribeiro et al. (2012), o rendimento do óleo essencial obtido por hidrodestilação das folhas frescas de *Rosmarinus officinalis* foi de aproximadamente 1,0 % em relação ao peso do material fresco. Através de análise em CG-EM, dos 25 picos



encontrados, foi possível identificar 23 componentes presentes no óleo essencial de alecrim analisado. Os constituintes majoritários foram o  $\alpha$ -pineno (19,8 %),  $\beta$ -mirceno (24,2 %), 1,8 cineol (22,2%) e verbenona (9,3 %), correspondendo a 75,5 % do total do óleo.

Resultados encontrados por Bauer, Garbe e Surburg (1997) e Tebaldi (2008) apontam o  $\alpha$ -pineno, 1,8 cineol e a cânfora como constituintes majoritários no óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*. Boix et al. (2010), encontraram como principais componentes, dos 25 compostos identificados,  $\beta$ -pineno (7,0%), mirceno (9,52%), 1,8 cineol (14,02%), cânfora (33,17%) e verbenona (8,6%). Trabalho realizado por Prins, Kaatz e Gibbons (2006) traz a cânfora, 1,8 cineol,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -mirceno, nessa ordem, como compostos em maior proporção no óleo.

Segundo Dellacassa et al. (1999) e Carvalho Junior (2004) , variações significantes na composição química do óleo essencial de alecrim, dependem da região de cultivo, do método de extração, do método de análise, da parte da planta utilizada (folha ou planta inteira) e do preparo da matéria prima (*in natura* ou seca) para obtenção de seus extratos. O que explica os diferentes teores dos constituintes e a variação da composição, relatados em diversos estudos (PRINS et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2007; BOIX et al., 2010).

#### 2.4.1 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA DE *R. officinalis*

A classificação botânica de *Rosmarinus officinalis* encontra-se na tabela 1.

Tabela 1: Classificação botânica de *Rosmarinus officinalis* (USDA, 2012).

NOME CIENTÍFICO	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.
DIVISÃO	Angiospermae
CLASSE	Dicotyledoneae (Magnóliopsida)
SUB-CLASSE	Asteridae
ORDEM	Solanales (Tubiflorae)
SUB-ORDEM	Verbeninae
FAMÍLIA	Lamiaceae
GÊNERO	<i>Rosmarinus</i>
NOME POPULAR	Alecrim
SINONÍMIA POPULAR	Alecrim-comum, alecrim-de-jardim, alecrim-de-horta, rosmarinho, erva-da-graça, flor-de-olimpico, rosa-marinha.

#### 2.4.2 HABITAT E CULTIVO

O alecrim vegeta espontaneamente em terrenos rochosos e arenosos do litoral de países em volta do Mar Mediterrâneo (Espanha, Itália, Grécia e Norte da África), e eventualmente, em outras como no centro e no sul de Portugal, Ilhas Canárias, Ilha dos Açores e da Madeira. Também cresce nativa em regiões da Turquia, Líbano e Egito (BISSET, 1994).

É plantado em escala comercial principalmente na Espanha, Sul da França, Tunísia, Marrocos, Iugoslávia e Sul da Itália. Alguns autores consideram o alecrim da Espanha como o de melhor qualidade do mundo (BISSET, 1994; HERTWING, 1991; BLUMENTHAL et al., 1998).

A boa qualidade do alecrim está diretamente relacionada com a latitude, condições do solo, clima, altitude, boa exposição à luz solar, e época de colheita (verão ou inverno). O teor de óleo essencial é bem maior no verão do que no inverno (CORRÊA JR. et al., 1994; SIMÕES et al., 1995; MARTINS et al., 2000).

Pode ser propagado na primavera ou verão brando, por sementes, ou então por estaquia (método de reprodução assexuada em plantas), antes ou depois da floração mais intensa. A propagação por sementes é demorada, pois a planta leva de 2 a 3 anos para se tornar adulta, pode resultar em indivíduos com características diferentes e consequentes variações das concentrações dos princípios ativos. As plantas originadas por estaquia alcançam a maturidade mais rapidamente, e reproduzem sempre as características da planta mãe (MARCHIORI et al., 2004).

Para o cultivo, sementeiras e viveiros devem ser localizados em lugares que recebam bastante luz solar, mas protegido dos ventos (BLUMENTHAL et al., 1998).

O rendimento da produção do alecrim é melhor quando cultivado em climas temperados quentes, e em regiões de dias longos com bastante luminosidade, porém não se adapta muito bem com invernos rigorosos e ventos fortes. As plantas tendem a aumentar sua altura quando as temperaturas noturnas não são muito baixas. As altas umidades atmosféricas e climas muito frios reduzem a qualidade aromática do alecrim (HERTWING, 1991).

A colheita do alecrim deve ser iniciada antes que se inicie o período de floração, no período da manhã, com tempo encoberto, a partir do segundo ou terceiro ano de vida da planta. Deve-se sempre fazer a colheita preferencialmente entre 6 e 10 horas da manhã. Mas de cada planta só deverá ser colhido metade dos ramos com folhas, deixando os restantes para a manutenção da mesma. Na secagem não devem ser empregadas temperaturas superiores a 35°C. Na armazenagem, utilizar recipientes herméticos, pois as folhas de alecrim perdem o aroma em poucos meses se conservadas em embalagens que possibilitem a entrada e saída de ar (MARCHIORI et al., 2004).

## 2.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PLANTAS E DE DERIVADOS DE *ROSMARINUS OFFICINALIS*

A resistência de patógenos humanos e animais a antibióticos ocorre em função da evolução biológica, sendo um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. O consumo de mais de uma tonelada diária de antibióticos em alguns países da Europa tem resultado na resistência de populações bacterianas, causando assim um sério problema de saúde pública. Duarte (2006) relatou o perigo do retorno a uma era pré-antibiótico. Em vista do presente cenário, a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais, incluindo plantas, tem ganhado importância nas indústrias farmacêuticas.

Tendo em vista que bactérias e fungos resistentes a múltiplos antimicrobianos e antifúngicos representam um desafio no tratamento de infecções, é necessário encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem utilizadas no combate a esses micro-organismos (PEREIRA et al., 2004). Diversos autores (GALLI et al., 1985; NEWALL et al., 2002; PORTE e GODOY, 2001) têm estudado a atividade antimicrobiana de plantas medicinais, dos condimentos e/ou especiarias, assim como de seus óleos essenciais, que progressivamente têm sido adicionados aos alimentos como aromatizantes.

Estudos sobre as atividades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de plantas nativas têm sido relatados em muitos países tais como Brasil, Cuba, Índia, México e Jordânia, que possuem uma flora diversificada e uma rica tradição na utilização de plantas medicinais para uso como antibacteriano ou antifúngico (DUARTE, 2006).

Os óleos essenciais são líquidos oleosos voláteis dotados de aroma forte e quase sempre agradável, provenientes do metabolismo secundário de plantas. São definidos como misturas complexas de substâncias lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (TRESSINO e GABRIEL, 2009).

De acordo com SIMÕES (2007) os óleos essenciais são extraídos das plantas frescas ou secas devendo ser conservados em recipientes bem fechados, pois são muito instáveis na presença de ar, luz, calor e umidade.

Dados sobre a atividade antimicrobiana de óleos essenciais, extratos vegetais e fitofármacos, avaliados frente a micro-organismos sensíveis e resistentes a antibióticos, bem como o possível efeito sinérgico da associação entre antibióticos e extratos, são relevantes, permitindo concluir que estudos mais detalhados sobre o uso terapêutico das plantas devem ser intensificados (ALVARENGA et al., 2007).

Grupos de pesquisadores de diferentes países têm estudado a inibição de *Candida albicans* por extratos, óleos essenciais e substâncias isoladas de plantas (DUARTE, 2006; GALLI et al., 1985; FARAG et al., 1989). Em muitos países tais como Índia, África e países da América Latina, a maioria dos trabalhos se inicia a partir de um levantamento etnofarmacológico, que identifica as espécies mais usadas pela população. Alguns países da América Latina mantêm programas de triagem de produtos naturais para atividade antimicrobiana, como é o caso de Cuba, Honduras, México e Brasil. Nos estudos realizados, a atividade antimicrobiana tem sido atribuída a pequenos terpenóides e compostos fenólicos como timol, carvona, carvacrol e mentol, que também na forma pura exibem atividade antibacteriana ou antifúngica (DUARTE, 2006). Mesmo com a elucidação insuficiente do mecanismo de ação dos ativos, a ação antimicrobiana parece estar associada ao caráter

lipofílico dos compostos, havendo um acúmulo em membranas e perda de energia pelas células.

Galli et al. (1985) testaram óleos e extratos obtidos pela destilação e concentração a vácuo de infusões alcoólicas e aquosas, respectivamente, de condimentos contra treze microorganismos Gram-negativos e Gram-positivos e treze leveduras e fungos filamentosos em meio de cultura sólido. Com as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas foi relatada resistência, sendo os bacilos e os clostrídios as linhagens mais sensíveis. Os fungos filamentosos foram mais sensíveis ao efeito inibitório do que as leveduras.

Farag et al. (1989) testaram seis óleos essenciais de condimentos (sálvia, alecrim, cominho, cravo e tomilho) e seus ingredientes básicos foram avaliados quanto ao seu efeito inibidor empregando três espécies de bactérias Gram-negativas, quatro espécies de bactérias Gram-positivas, uma bactéria produtora de ácido e uma cepa de levedura. No estudo, os autores determinaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pelo método de difusão em ágar, medindo a concentração mínima inibidora para cada óleo essencial. As concentrações menores de vários óleos essenciais foram suficientes para evitar o crescimento microbiano. Os dados mostraram que as bactérias Gram-positivas são mais sensíveis aos componentes antimicrobianos dos condimentos do que as Gram-negativas.

Além da atividade antimicrobiana, as propriedades antioxidantes do extrato e óleo de alecrim têm recebido considerável atenção nos últimos anos, sendo reconhecidas desde a antiguidade. Estudos têm sido realizados para determinar a estrutura química dos constituintes ativos do vegetal, sendo que, rosmanol e os diterpenos rosmaridifenol e rosmariquinona já foram identificados (PRINS et al., 2006; NEWALL et al., 2002; SILVA, 2008). A folha de *Rosmarinus officinalis* Linn. (alecrim) tem sido utilizada popularmente por suas propriedades anti-hipertensiva e digestiva (SILVA, 2008). Seu óleo essencial é constituído por hidrocarbonetos monoterpênicos, ésteres terpênicos, linalol, verbinol, terpineol, 3-octanona e acetato de isobornila. Os terpenóides são representados pelo carnosol, ácidos carnosílico, oleânico, ursólico, entre outros. Os flavonóides incluem diosmetina, diosmina, gencuanina, luteolina, hispidulina e apigenina. Apresenta ainda os ácidos rosmarínico, caféico, clorogênico, neoclorogênico e labiático (SILVA, 2008). Dentre as ações farmacológicas de *R. officinalis* tem-se observado atividade hipoglicemiante, inibidor da enzima acetilcolinesterase e  $\alpha$ -amilase, (BARBOSA-FILHO et al., 2006). Também foi encontrada atividade antimicrobiana sobre fungos e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Corinebacterium*, *Lactobacillus brevis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhodotorula glutinis* e

*Kluyveromyces bulgaricus* (NEWALL et al., 2002), *Micrococcus luteus*, *Salmonela* spp.e *Listeria monocitogens* (SILVA, 2008).

Alvarenga et al. (2007) relataram a ação antimicrobiana de extratos de alecrim frente a bactérias sensíveis e resistentes a antibióticos sintéticos, verificando sinergismo entre antibióticos e os extratos usados, possibilitando que antibióticos ineficazes apresentassem ação sobre bactérias resistentes.

## 2.6 CÁRIE DENTÁRIA

A cavidade oral é constantemente colonizada por micro-organismos, cujas espécies se inter-relacionam constantemente e também com o hospedeiro, competindo pela sua sobrevivência. As bactérias colonizam toda a superfície de um animal, mas estão particularmente concentradas na cavidade bucal e no trato gastrointestinal inferior. A cavidade bucal humana hospeda mais de 400 espécies de bactérias, que já foram isoladas e identificadas. Fazem parte da microbiota oral micro-organismos anaeróbios, aeróbios, facultativos e microaerófilos, sendo que os estreptococos constituem parte essencial da mesma (NEWMAN et al., 2007). O fato de os estreptococos, principalmente os do grupo *mutans*, colonizarem as superfícies da cavidade oral em grande número tem chamado a atenção de muitos pesquisadores nesta área. Nas superfícies dos dentes não ocorre nenhuma renovação epitelial, o que contribui para que esses micro-organismos possam colonizar e desenvolver nessas superfícies (HÖFLING et al., 1999).

O *Streptococcus mutans* é um micro-organismo gram-positivo que está intimamente associado à cárie dentária, apresentando a capacidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares aderentes, a partir da sacarose, e polissacarídeos intracelulares a partir de carboidratos fermentáveis. Pode ser identificado em meios de cultura sólidos (com altas concentrações de sacarose), onde forma colônias elevadas e irregulares (LOESCHE, 1993). Esta espécie geralmente coloniza a superfície dental, sendo que a área de maior frequência de localização é a região mais apical dos pontos de contato entre os dentes (AHAMADY et al., 1993).

Alguns micro-organismos tidos como patógenos periodontais, possuem a capacidade de implantar-se no sulco gengival, invadindo o tecido periodontal, por mecanismos que lhes permitem resistir aos fatores de defesa do hospedeiro (RUBIRA, 1993).

Sabe-se que o aumento da incidência da cárie é determinado pelo aumento dos *Streptococcus* do grupo *mutans* e/ou por alterações na homeostasia salivar (SPOLIDORIO et al., 2001).

A dieta cariogênica (alta ingestão de açúcares, ex: sacarose), também é um fator importante no desenvolvimento da infecção (FREIRE et al., 2002).

O controle das espécies de *Streptococcus*, reconhecido como uma das principais bactérias responsáveis pela cárie dentária tem sido realizada com o uso de produtos antimicrobianos, como forma preventiva de inibir o crescimento destas espécies de bactérias. A forma de aquisição desta bactéria é por contato direto entre os hospedeiros com objetos inanimados (chupetas e brinquedos) ou através da saliva (principal via de transmissão) ou ainda pela mãe (a mais importante fonte de infecção). Embora estas bactérias apresentem vias de transmissão, sintomatologia e mecanismos de infecção diferentes, as doenças bucais causadas por micro-organismos são consideradas grandes problemas de saúde pública (ALVARENGA et al., 2007).

#### 2.6.1 BIOFILME DENTAL

Biofilme dental é o acúmulo de bactérias colonizadoras da cavidade oral na superfície dos dentes. É formado por bactérias, substâncias provenientes da saliva, sangue, fluido gengival e restos alimentares. Essa colonização bacteriana se dá normalmente em poucas horas, mesmo que os procedimentos de higiene sejam realizados regularmente (SILVA et al., 2011).

A formação do biofilme dentário ocorre a partir de processos complexos, que proporcionam a instalação de uma comunidade microbiana diversificada, cooperativa, dinâmica, de elevado potencial patogênico e, muitas vezes, resistente a agentes antimicrobianos. Tais processos envolvem mecanismos de aderência dos microrganismos à película adquirida bem como de co-adesão microbiana entre espécies semelhantes (homotípica) ou diferentes (heterotípica), mediadas por glicoproteínas salivares e receptores de superfície celular. Esses processos são responsáveis pela sucessão bacteriana, gerando ambientes favoráveis à colonização por bactérias cariogênicas, como o *Streptococcus mutans* e o *Lactobacillus casei* (FREIRES et al., 2010; PINTO, 2008).

É considerado o agente etiológico primário das doenças periodontais inflamatórias se não removido adequadamente (LINDHE, 1992; DITTERICH et al., 2007).

A remoção ativa do biofilme dental realizada pelo próprio indivíduo através de métodos mecânicos tem por objetivo a desestruturação dos micro-organismos aderidos e a prevenção da sua recorrência e é denominada de controle mecânico individual do biofilme dental. O controle mecânico é realizado através de escovações, o correto uso do fio dental e de outros agentes de limpeza interproximal, como por exemplo, os enxaguatórios bucais. (DIAS et al., 2006; DITTERICH et al., 2007).

O controle mais eficaz do biofilme dental é a correta higienização através de escovação e uso do fio dental. A escovação é o recurso mais utilizado, com a função de desagregar e remover os depósitos microbianos aderidos, através da ação mecânica das cerdas da escova. O fio dental por sua vez, tem como função remover o biofilme dental dos espaços interproximais dos dentes, contribuindo para a prevenção de cáries, gengivite e halitose.

#### 2.6.2 PLACA DENTÁRIA

A literatura define a placa dentária como uma substância estruturada, amarelado-acinzentada, que adere firmemente às superfícies duras intra-orais, incluindo as restaurações removíveis e fixas. É composta por bactérias (aproximadamente  $10^{11}$  bactérias/g de placa) em uma matriz de glicoproteínas salivares e polissacarídeos extracelulares. Esta matriz torna-se possível removê-la pelo bochecho ou pelo uso de sprays. Mais de 500 espécies microbianas podem ser encontradas na placa dentária. Os micro-organismos não bacterianos encontrados na placa incluem espécies de *Mycoplasma*, leveduras, protozoários e vírus (FIGUEIREDO, 2009).

A placa é classificada como supragengival encontrada na margem gengival ou acima desta e subgengival encontrada abaixo da margem gengival, entre os dentes e o epitélio da bolsa gengival (ETO et al., 2003).

A composição microbiana da placa supragengival apresenta uma organização estratificada de acumulação em diversas camadas de morfotipos bacterianos. Cocos e bastonetes curtos gram-positivos são predominantes na superfície dos dentes, já na lateral da massa da placa madura predominam os bastonetes, espiroquetas e filamentos gram-negativos. A placa subgengival apresenta composição diferente, devido à disponibilidade local de produtos sanguíneos e ao ambiente anaeróbio, são encontrados micro-organismos filamentosos, cocos gram-positivos e bastonetes, incluindo *Streptococcus mitis*, *S. sanguis* e espécies de *Eubacterium* (NEWMAN et al., 2007).



O processo de formação da placa é dividido em três etapas: formação da película na superfície dentária; aderência inicial e fixação bacteriana; e colonização e maturação da placa.

O controle de placa bacteriana pode ser mecânico, químico ou a associação de ambos. Hoje o método mais utilizado, atuando na sua prevenção e remoção, é o controle mecânico, que é uma técnica simples constituída por vários dispositivos de limpeza dos dentes, porém suas armas mais poderosas, por serem mais eficientes, são as escovas dentais e os meios de limpeza interproximal (GEBRAN et al., 2002; SWERTS et al., 2005).

Um dos agentes químicos mais utilizados no combate à placa é a Clorexidina, que é considerado o agente antigengivite e antiplaca mais efetivo. Sua atividade pode ser explicada pela interrupção da membrana celular bacteriana pelas moléculas de clorexidina, aumentando sua permeabilidade e resultando em lise e morte celulares (GARIB et al., 1997; BARROS et al., 2000).

## 2.7 ENXAGUATÓRIOS BUCAIS E PLANTAS MEDICINAIS

A eficácia de plantas medicinais, empregadas tanto em dentifrícios como em enxaguatórios bucais tem sido investigada para o tratamento de gengivites. Os resultados sugerem que tais princípios ativos podem ser utilizados como apoio à terapia das doenças periodontais e como profilaxia de rotina (ZANIN et al., 2007).

A abrangência da utilização de fitoterápicos e de plantas medicinais é vasta e engloba fins variados, sobretudo em relação à saúde bucal. Considerando as doenças periodontais, podemos defini-las como processos infecciosos que resultam em potente resposta inflamatória (MONTEIRO et al., 2002).

O uso dos enxaguatórios bucais remonta a meados de 1800 e foi se consolidando com o tempo devido às dificuldades com os métodos de higiene oral mecânica, pois são de uso fácil, refrescante, possuem acesso às bactérias mesmo em áreas de maior dificuldade e palatabilidade (ZANIN et al., 2007; JARDIM e JARDIM, 1998).

Geralmente a eficácia dos anti-sépticos orais é atribuída à sua atividade bactericida, preferencialmente em produtos de efeito intra-oral prolongado, definido como substantividade ou habilidade de um agente ativo de colar na superfície do tecido a ser tratado e de ser liberado com o tempo, provendo atividade antibacteriana sustentada (ASADOORIAN, 2006).

Com a finalidade de auxiliar os métodos convencionais de higiene bucal, muitos agentes químicos vêm sendo estudados, entre eles os antibióticos, compostos quaternários de

amônio, acetato e gluconato de clorexidina e outros (OLIVEIRA et al., 1998). No entanto, o uso freqüente e por longo prazo da clorexidina, apresenta alguns efeitos indesejáveis como: ardência bucal, alteração do paladar e pigmentação dos dentes (REY, 1999). Outros ativos, como anti-inflamatórios e antissépticos, também vêm sendo utilizados amplamente para afecções da mucosa bucal.

Inúmeras substâncias químicas vêm sendo pesquisadas, com o objetivo de inibir a formação do biofilme dental, crescimento bacteriano, e conseqüentemente a adesão de micro-organismos à superfície dentária (RODRIGUES JUNIOR, 1998). Dentre estas substâncias, atualmente se destacam os produtos de origem vegetal por se mostrarem potencialmente eficazes no que se refere à sua atividade antimicrobiana sobre várias espécies de micro-organismos (GEBARA; ZARDETTO; MAYER, 1996).

Uma pesquisa realizada por Trevizani (2002), com o extrato hidroalcoólico de *Rosmarinus officinalis* (alecrim), contendo em associação, extrato hidroalcoólico das plantas *Plantago major* (tanchagem), *Tabebuia impetiginosa* (ipê roxo), *Achillea millefolium* (mil-folhas) e *Nasturtium officinale* (agrião), observou a redução do índice de sangramento gengival em indivíduos do grupo de estudo que fizeram uso de gel dentifrício, sugerindo potente efeito antigengivite, através de possível efeito antiinflamatório de seus componentes ativos e/ou por alteração da qualidade do biofilme dento-bacteriano.

A formação do biofilme ocorre através de um processo ordenado e dinâmico onde há necessidade da fixação e proliferação de bactérias sobre as superfícies dos dentes (PEREIRA et al., 2006); a aderência bacteriana à película adquirida representa um dos primeiros mecanismos envolvidos na iniciação do desenvolvimento do biofilme dental (ALMEIDA, 2002).

A remoção mecânica do biofilme é um fator importante na prevenção da cárie e doença periodontal. No entanto, existem dificuldades na remoção feita pelo próprio paciente (PEREIRA et al., 2006; STEFANI; LIMA, 1996). Por se tratar de uma associação organizada, proliferante, enzimaticamente ativa, capaz de se aderir à superfície dos dentes, ocasionando alterações patológicas na cavidade bucal, é indicada sua desorganização tão logo quanto possível (PEREIRA et al., 2006). Considerando a importância dessa desorganização e as dificuldades de manter os indivíduos motivados para realizar uma adequada limpeza da cavidade bucal, com o objetivo primário em termos de saúde bucal, que é controlar o acúmulo das bactérias sobre as estruturas dentárias, é necessário associar aos procedimentos mecânicos também métodos químicos para o controle do biofilme dental (CURY, 1997).

Devido a agressão contínua, o biofilme dental em cada etapa do seu desenvolvimento vai adquirindo novas espécies microbianas, dentre estas *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus casei*; que apresentam capacidade de provocar danos ao esmalte e tecido gengival (PEREIRA et al., 2006; PERES, 2003).

A incidência de *Candida* sp. na cavidade bucal e as razões para o estabelecimento da candidose são decorrentes de fatores precipitadores tais como: queda de imunidade do hospedeiro, desordens endócrinas, lesões em mucosas, higiene oral deficiente, tratamento prolongado com antibióticos e corticosteróides (RAMIREZ et al., 1997).

Para o controle destas patologias bucais são utilizados fármacos que, na maioria são sintetizados em laboratório, e para os quais, muito tempo e recursos econômicos são gastos em pesquisas até sua utilização (ZANIN et al., 2007).

Embora a fitoterapia seja muito usada nos cuidados da saúde, no que se refere à saúde bucal, ainda é um pouco negligenciada. Entretanto, os produtos de higiene oral com ativos de origem vegetal estão sendo cada vez mais estudados com protocolos mais modernos que comprovem a eficácia da utilização de determinadas plantas no tratamento das doenças bucais com benefícios à população. As indicações usuais até então mencionadas foram o tratamento de inflamações, odontalgias e processos cicatriciais, destacando-se a decocção, a maceração e a infusão como formas de utilização (ZANIN et al., 2007).

A investigação de materiais naturais como fontes de novos agentes antibacterianos têm aumentado potencialmente nos últimos vinte anos, em que diferentes extratos de plantas medicinais, condimentares e aromáticas têm sido testados (ALVARENGA et al., 2007).

Alguns componentes de óleos essenciais tais como timol, eucaliptol, mentol, e outros, têm sido empregados nos tratamentos de afecções bucais. Em relação ao produto industrializado como enxaguatório bucal, o produto Listerine® (Warner-Lambert) é amplamente conhecido e comercializado. Este é uma mistura de timol, mentol, eucaliptol e salicilato de metila. Estudos de curta duração demonstram que ocorreu a redução do biofilme e da gengivite, em média, de 35% e os estudos de longa duração têm mostrado uma redução de 25% na formação de biofilme e de 29% na gengivite. O mecanismo de ação parece estar relacionado à alteração da parede celular bacteriana. Como efeitos adversos foram citados a sensação de queimação e ardência na boca (BUGNO et al., 2006).

O enxaguatório bucal Sorriso Herbal® (Kolynos do Brasil) contém ervas medicinais como: camomila, sálvia, mirra, melaleuca e eucalipto. Já o produto, Sorriso Herbal® com

cálcio possui associação de erva doce, melissa e hortelã e o Parodontax® (GSK) é uma associação de tintura de equinácea, mirra, ratânia, sálvia e camomila (BUGNO et al., 2006).

Estudos clínicos confirmam a eficácia do dentifrício Parodontax® na redução do biofilme bacteriano, do sangramento gengival e de gengivites. Outros produtos são comercializados pela Indústria Weleda, entre eles géis dentifrícios e enxagüatórios bucais, contendo extratos vegetais (ratânia e calêndula). No mercado europeu, encontram-se disponíveis dentifrícios contendo em associação extratos vegetais contendo *Plantago major*, *Cochlearia armoracia*, *Calendula officinalis* e *Hamamelis virginiana*, como o Homeodent®, e o Homeodent 2® (contendo *Plantago major*, *Cochlearia armoracia*, *Calendula officinalis*, *Hamamelis virginiana* e *Phytolaca decandra*), ambos produzidos pelo Laboratório Francês Boiron (BUGNO et al., 2006).

Atualmente, estudos (ZANIN et al., 2007; TREVIZANI, 2002; ALMEIDA et al., 2010; SILVA, 2010) têm demonstrado a eficácia destas plantas, cuja utilização já está difundida entre a população. Tal fato reforça a necessidade de intensificação dos estudos destas plantas em relação às atividades anti-inflamatórias, antissépticas, cicatrizantes e analgésicas, quando usadas isoladamente, ou em associação.

Desta forma a utilização de produtos fitoterápicos parece ser economicamente viável, mostrando-se como uma alternativa interessante contribuindo para melhorar o acesso da população aos cuidados com a prevenção e tratamentos de doenças periodontais.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação antimicrobiana do extrato etanólico e frações de *Rosmarinus officinalis* frente à bactéria *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e o fungo *Candida albicans* ATCC 10231.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Coletar e preparar extrato etanólico e frações de *Rosmarinus officinalis*.

Quantificar fenóis totais e flavonóides do extrato etanólico e suas frações.

Avaliar a ação antimicrobiana do extrato de *R. officinalis* e suas frações sobre a cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Candida albicans* ATCC 10231, empregando método de difusão em ágar.

Realizar os testes CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CIMA (Concentração Inibitória Mínima de Aderência) com o extrato de *R. officinalis* e suas frações .

Desenvolver formulação de um enxaguatório bucal com a fração do extrato mais eficaz.

Realizar associação entre princípios ativos de enxaguatórios bucais, clorexidina e fluoreto de sódio e o extrato de *R. officinalis* verificando o sinergismo entre eles.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 COLETA DE FOLHAS DE *ROSMARINUS OFFICINALIS*

As folhas de *Rosmarinus officinalis* utilizadas no presente trabalho foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, no período de 07 a 14 de Fevereiro de 2012, no horário da manhã. Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Juiz de Fora (CESJ nº 48253). Após a coleta, o material vegetal foi submetido à secagem em estufa sob ventilação forçada por 48 horas a  $\pm 37$  a  $40^{\circ}\text{C}$  e triturado em liquidificador industrial, pesado e armazenado em local seco e com ausência de luz para o preparo dos extratos.

### 4.2 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO

O material pulverizado foi submetido à extração por maceração estática em etanol P.A.. Após a retirada do solvente por rota-evaporação no equipamento Rotavapor® RII-Buchi, parte do extrato etanólico seco foi suspenso em uma solução de Água: Etanol (9:1) seguido de partição líquido/líquido com solventes orgânicos de polaridades crescentes: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol (Figura 3). A suspensão formada foi novamente submetida ao Rotavapor® RII-Buchi para retirada dos solventes, dando origem às frações secas de *R. officinalis*.

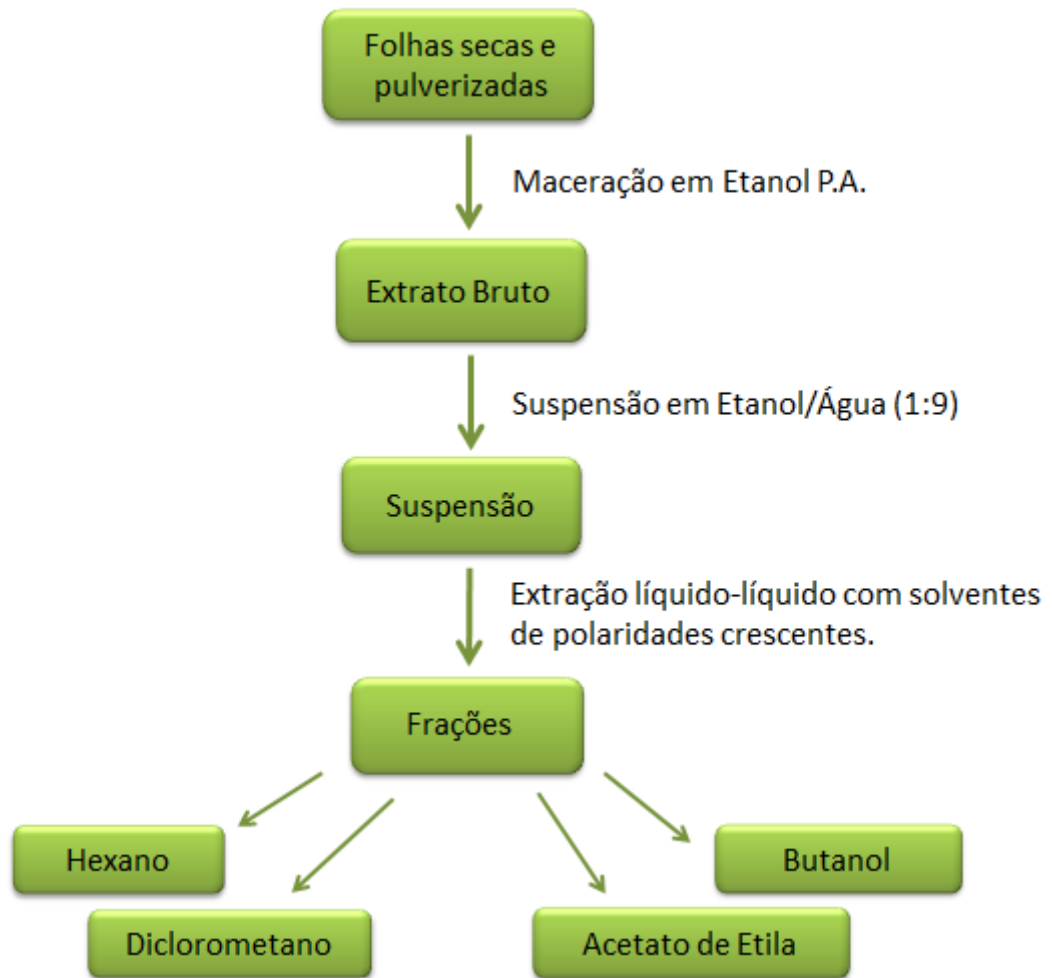


Figura 3: Esquema de extração e fracionamento da amostra de *Rosmarinus officinalis*.

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FENÓIS E FLAVONÓIDES TOTAIS

##### 4.3.1. DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE FENÓIS

Realizou-se a determinação do teor de fenóis totais presentes nas amostras de extrato etanólico e das frações por meio de espectrofotometria de absorção na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu (SOUSA et al., 2007).

Utilizou-se, na análise, o ácido gálico foi utilizado como substância padrão de referência na análise. Primeiramente, para a construção da curva de calibração, preparou-se uma solução-estoque aquosa de 1 mg/mL e depois uma solução aquosa diluída do reagente de Folin-Ciocalteu com 10 mL do reagente em balão de 100 mL.

Transferiu-se para uma bateria de cinco tubos em triplicata, 0,01mL (tubo1), 0,02 mL (tubo 2) , 0,03 mL (tubo 3) , 0,04 mL (tubo 4) e 0,05 mL (tubo 5) da solução-estoque de ácido gálico. Em cada tubo foram adicionados 5 mL do reagente diluído de Folin-Ciocalteau, 4 mL de carbonato de sódio e água em quantidade suficiente para completar o volume em 10 mL. O padrão permanece uma hora em temperatura ambiente.

Efetuuou-se varredura espectrofotométrica com a solução número três de 420 a 900 nm, obtendo-se pico do espectro de absorção em 765 nm (SOUSA et al., 2007). A partir deste comprimento de onda (765 nm), as absorbâncias das soluções de ácido gálico foram determinadas para montagem da reta de calibração. Para isto, foi usada a análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e determinação do coeficiente de correlação (r).

A quantificação dos fenóis totais do extrato etanólico e das frações foi realizada seguindo o mesmo procedimento analítico descrito. O extrato etanólico e as frações foram avaliados para determinação de suas absorbâncias. A absorbância obtida de cada solução foi substituída na equação da reta do padrão e a concentração obtida foi ajustada em teor de fenóis totais.

#### 4.3.2 DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES

Realizou-se a quantificação do teor de flavonóides totais por método espectrofotométrico (VENNAT et al., 1992; SOBRINHO et al., 2008). Na reação para quantificação, foram utilizados os reagentes ácido acético glacial, solução de piridina a 20% em etanol e solução a 8% de cloreto de alumínio. Empregou-se a rutina como substância padrão de referência para a obtenção da curva de calibração, em que os dados foram submetidos à análise de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, sendo calculada a equação da reta e o coeficiente de correlação (r). O comprimento de onda empregado nas leituras das absorbâncias das soluções teste foi de 418 nm. As amostras foram analisadas em triplicata.



#### 4.4 CEPA DE MICRO-ORGANISMO PADRÃO EMPREGADO NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As cepas padrões utilizadas nos testes foram: *Streptococcus mutans* ATCC 25175, lote 0307015 e *Candida albicans* ATCC 10231, lote 030640006; ambas doadas pelo Laboratório de Microrganismos de Referência da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Janeiro de 2012.

#### 4.5 PREPARO DA SUSPENSÃO PADRONIZADA DAS CEPAS DOS MICRO-ORGANISMOS PADRÕES

Para cada cepa foram realizados repiques em triplicata contendo meio de cultura correspondente, inclinado. Os tubos foram incubados em estufa (FANEN®), cerca de 24 horas.

Preparou-se uma suspensão microbiana diluída em solução fisiológica esterilizada, para obtenção de transmitância 25% a 580 nm medida em espectrofotômetro modelo SP 432 (FENTO®). A partir desta suspensão foram realizadas diluições decimais seriadas utilizando solução fisiológica esterilizada como diluente, até a diluição  $10^{-7}$ . Das três últimas diluições, isto é,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ , transferiu-se 1 mL para placa de *Petri* e em seguida adicionado 20mL do meio de cultura correspondente (procedimento realizado em duplicata). As placas foram incubadas por cerca de 24 horas. Após este período foi realizada a contagem das colônias em cada placa, sendo determinado o número de unidades formadoras de colônia (UFC) por mL da suspensão microbiana.

Para o crescimento da bactéria *Streptococcus mutans* o meio de cultura utilizado foi *Tryptic Soy Agar* (TSA) (Difco®), e a temperatura de incubação foi de  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , por cerca de 24 horas. Para o fungo *Candida albicans* o meio de cultura foi o *Ágar Sabouraud Dextrose*, e a temperatura de incubação foi de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , por cerca de 48 horas.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM MEIO DE CULTURA SÓLIDO POR TÉCNICA DE DIFUSÃO EM AGAR

Utilizou-se 15 mL de meio de cultura fundido em placas de *Petri* esterilizadas. Sobre a superfície do meio solidificado adicionou-se 5 mL de meio de cultura fundido e com temperatura média de 45°C inoculado com 1% da suspensão microbiana de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ou *Candida albicans* ATCC 10231 padronizada a 25 % transmitância (580 nm).

Em seguida, 200 µL das soluções testes e da substância padrão foram introduzidos em cilindros de aço inox de 5 mm de diâmetro, previamente colocados sobre o meio de cultura já solidificado. Após cinco minutos as placas foram incubadas a  $35 \pm 2$  °C ou  $25 \pm 2$  °C por cerca de 24 horas. Após esse período os halos de inibição de crescimento microbiano foram medidos com o auxílio de um paquímetro. Este ensaio foi realizado em triplicata e em três dias diferentes.

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DO EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE *Rosmarinus officinalis*

O ensaio de susceptibilidade pelo método de microdiluição em caldo foi realizado usando o método descrito pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para determinação da CIM (CLSI, 2009). Os testes foram realizados utilizando caldo *Brain Heart Infusion* (BHI). A cepa bacteriana foi cultivada “overnight” a  $35 \pm 2$  °C de 18 a 24h em ágar *Tryptic Soy Agar* (TSA) (Difco®). Para a cepa de *C. albicans* foi utilizado o caldo *dextrose Sabouraud* (SDB) para a determinação da CIM e meio *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) para o cultivo. Diluições sucessivas a partir da solução estoque de 12,5 mg/mL foram testadas em microplacas de 96 poços variando nas concentrações de 5,0 a 0,0025 mg/mL. Para isso, foram utilizadas soluções estoque de cada uma das amostras de 12,5 mg/mL em DMSO 1%. Foram transferidos 180 µL dessa solução para as microplacas que já continham 200 µL de meio de cultura (poços A1 a A9). Depois de homogeneizada, passou-se da fila A para a fila B 180 µL, e assim sucessivamente, até a fila H (Figura 4). A partir da fila B, todos os poços já continham 180 µL de BHI. Para completar o volume final de 200 µL, foram adicionados 20 µL

de suspensão microbiana a 25% de transmitância à 580 nm. As placas foram incubadas por cerca de 24 horas a  $35 \pm 2$  °C.

O mesmo procedimento foi executado para o controle positivo (BHI + microrganismo) e o controle negativo (BHI + extrato). A clorexidina foi usada como substância de referência no ensaio com *S. mutans* nas concentrações de 5 a 0,039  $\mu\text{g/mL}$ ; sendo o nitrato de miconazol empregado para avaliar a inibição da *C. albicans* nas concentrações de 5 a 0,039  $\text{mg/mL}$ , respectivamente. A CIM foi calculada como a menor diluição que apresentou completa inibição da cepa testada. Todos os testes foram realizados em duplicatas, em três dias diferentes.

A leitura deu-se pela observação da presença de turbidez indicativa de crescimento microbiano. Para melhor visualização dos resultados utilizou-se solução de Cloreto de Trifeniltetrazolio, na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , sendo 10  $\mu\text{L}$  dessa solução aplicados em cada poço das placas. Após incubação por 30 minutos, foram observados poços com alteração da coloração para vermelho, indicativo de crescimento bacteriano. Poços em não houve alteração da cor correspondeu à ausência de crescimento microbiano.

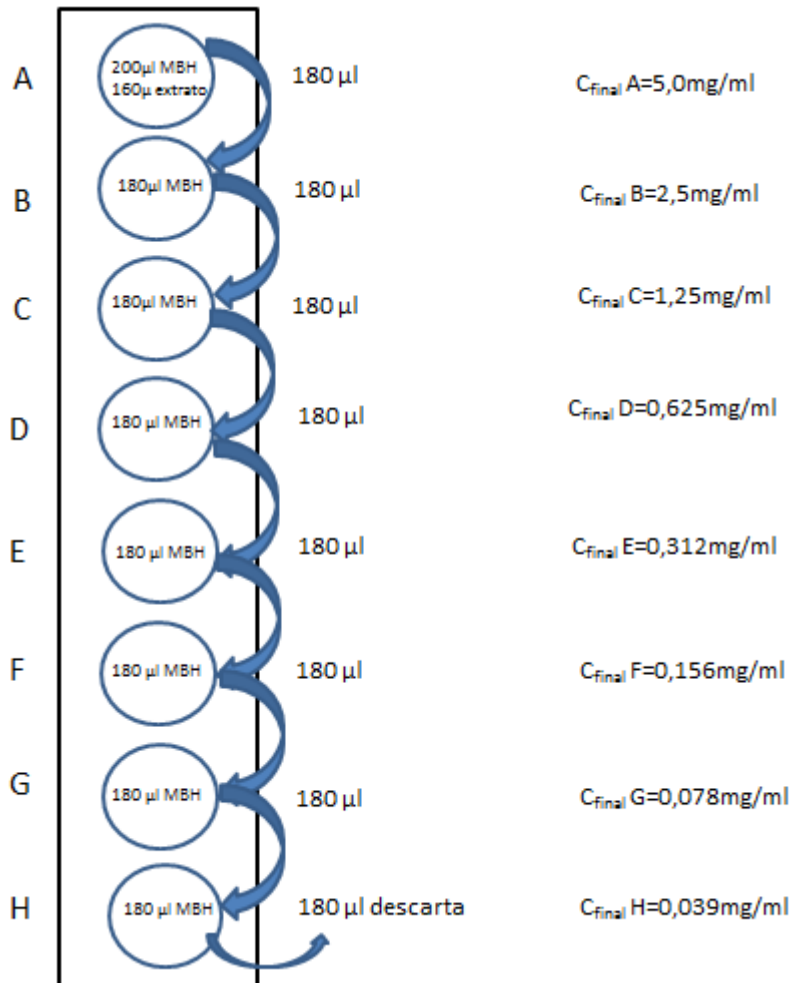


Figura 4. Esquema de diluições sucessivas nos poços no teste de microdiluição em placas empregando suspensão microbiana de *S. mutans* ATCC 25175 e *C. albicans* ATCC 10231, segundo método descrito na CLSI (2009).

#### 4.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ADERÊNCIA (CIMA) DO *Streptococcus mutans* ATCC 25175 A UMA SUPERFÍCIE

A concentração inibitória mínima de aderência (CIMA) da bactéria ao vidro foi determinada empregando sacarose na concentração de 5% no meio de cultura, usando diluições seriadas decimais das concentrações do extrato etanólico e frações de *Rosmarinus officinalis*. Foram distribuídos 1,8 mL de meio de cultura *Brain Heart Infusion* (Difco®) inoculados com  $10^6$  UFC/ mL da suspensão de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, em tubos de ensaio pequenos. Em seguida foi adicionado 0,2 mL da solução correspondente a cada diluição das soluções dos extratos e das substâncias padrões. As concentrações das amostras,

variaram de 25mg/mL a 3,12 mg/mL. A clorexidina foi usada como substância de referência e foi preparada nas concentrações de 100 µg/mL a 12,5 µg/mL em água destilada.

Os tubos de ensaio foram incubados em estufa (FANEN®) a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por cerca de 24 horas, com os tubos inclinados a  $30^\circ$  em relação ao plano. Foi realizada a observação visual da aderência das células bacterianas na parede do tubo de ensaio após sua agitação.

A CIMA foi definida como a menor concentração do agente em meio com sacarose que impediu a aderência ao tubo de vidro.

#### 4.9 PREPARAÇÃO DO ENXAGUATÓRIO BUCAL CONTENDO EXTRATO DE *Rosmarinus officinalis*

Conforme os resultados dos testes: atividade antimicrobiana, CIM e CIMA, foram desenvolvidas 18 formulações de enxaguatório bucal. Os lotes e fornecedores das matérias primas utilizadas nas formulações desenvolvidas encontram-se na tabela 2.

As formulações dos enxaguatórios bucais com extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis* encontram-se na tabela 3 denominadas em ordem alfabética de A a I, e as formulações desenvolvidas com a fração hexânica encontram-se na tabela 4 denominadas de J a R.

Tabela 2 – Lotes e fornecedores das matérias primas das formulações de enxaguatórios bucais.

<b>Componentes</b>	<b>Lotes</b>
Benzoato de Sódio	020137 – Valdequímica
Sacarina	ALL 35070 – All Chemistry
Propilenoglicol	A955CCKL11 – Pharma Nostra
EDTA dissódico	120705#4 – Fagron
Óleo essencial de menta	ALL 47841 – All Chemistry
Hidróxido de Sódio 20%	ALL 43317 - All Chemistry

Tabela 3: Composição do enxaguatório bucal com diferentes concentrações do extrato etanólico de *R. officinalis*, fluoreto de sódio e digluconato de clorexidina.

Formulações de Enxaguatório Bucal									
Componentes	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Benzoato de Sódio	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
Sacarina	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
Propilenoglicol	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%
EDTA dissódico	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%
Extrato Etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i>	0,1%	5%	10%	0,1%	5%	10%	0,1%	5%	10%
Fluoreto de Sódio	---	---	---	0,05%	0,05%	0,05%	---	---	---
Digluconato de Clorexidina	---	---	---	---	---	---	0,12%	0,12%	0,12%
Óleo essencial de menta	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.
Água destilada	q.s.p. 100mL	q.s.p. 100mL	q.s.p. 100mL	q.s.p. 100mL	q.s.p. 100mL	q.s.p. 100mL	q.s.p. 100mL	q.s.p. 100mL	q.s.p. 100mL

pH final das formulações – 6,3

Tabela 4 – Composição do enxaguatório bucal com diferentes concentrações da fração hexânica de *R. officinalis*, fluoreto de sódio e digluconato de clorexidina.

Formulações de Enxaguatório Bucal									
Componentes	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
Benzoato de Sódio	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
Sacarina	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
Propilenoglicol	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%
EDTA dissódico	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%
Fração Hexânica de <i>Rosmarinus officinalis</i>	0,05%	5%	10%	0,05%	5%	10%	0,05%	5%	10%
Fluoreto de Sódio	---	---	---	0,05%	0,05%	0,05%	---	---	---
Digluconato de Clorexidina	---	---	---	---	---	---	0,12%	0,12%	0,12%
Óleo essencial de menta	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.
Água destilada	q.s.p. 100mL	q.s.p. 100mL	q.s.p. 100mL	q.s.p. 100mL	q.s.p. 100mL	q.s.p. 100mL	q.s.p. 100mL	q.s.p. 100mL	q.s.p. 100mL

pH final das formulações – 6,3

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FENÓIS E FLAVONÓIDES TOTAIS

Para a determinação do teor de fenóis totais, realizou-se uma varredura espectrofotométrica entre 420 e 900 nm. O espectro de absorção da solução padrão de ácido gálico (Figura 5) foi obtido e o comprimento de onda de maior absorção foi em 765 nm que foi empregado no método de quantificação dos fenóis totais (SOUSA et al., 2007).

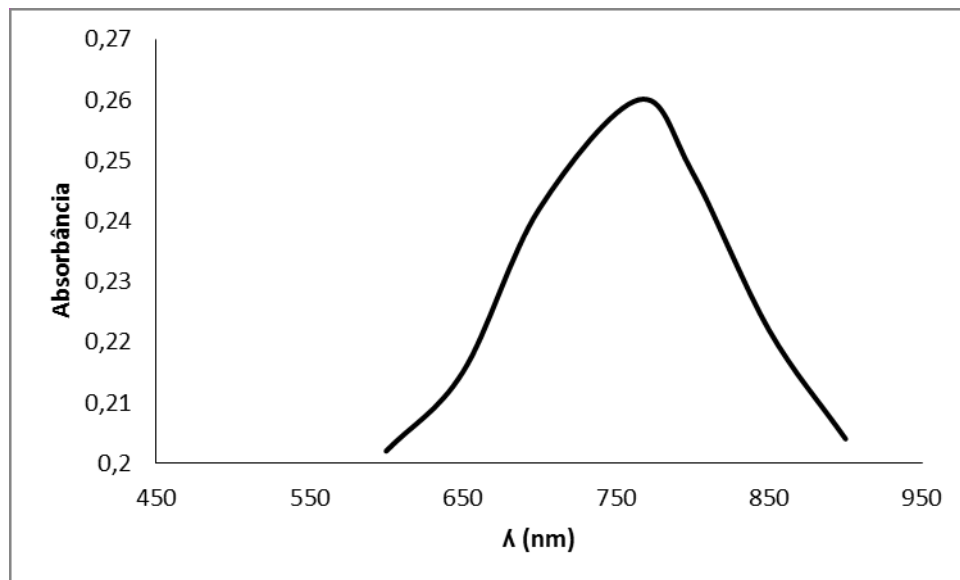


Figura 5: Varredura espectrofotométrica obtida com a solução da substância padrão Ácido Gálico na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ .



Após definição do comprimento de ondas com maior absorção, a reta de calibração do ácido gálico foi obtida para determinação dos teores de fenóis totais (Figura 6).

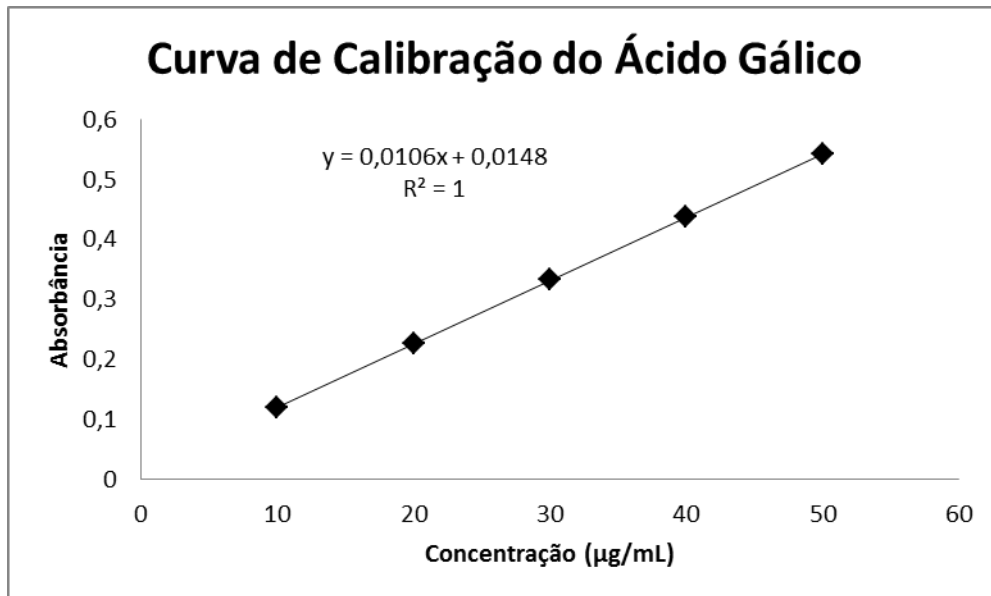


Figura 6: Curva espectrofotométrica obtida com a solução da substância padrão Ácido Gálico nas concentrações 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL e 50 µg/mL. Para obtenção da equação da reta.

Para estabelecer o método de quantificação do teor de flavonóides totais, foi realizada uma varredura espectrofotométrica entre 350 e 550 nm com uma solução de rutina na concentração de 5 µg/mL para obter o espectro de absorção (Figura 7). Conforme a figura 7, o comprimento de onda em 418 nm apresentou máximo de absorção e foi usado para obtenção da reta de calibração e determinação dos flavonóides totais. A curva espectrofotométrica obtida foi semelhante à obtida no trabalho de Sobrinho et al., (2008).

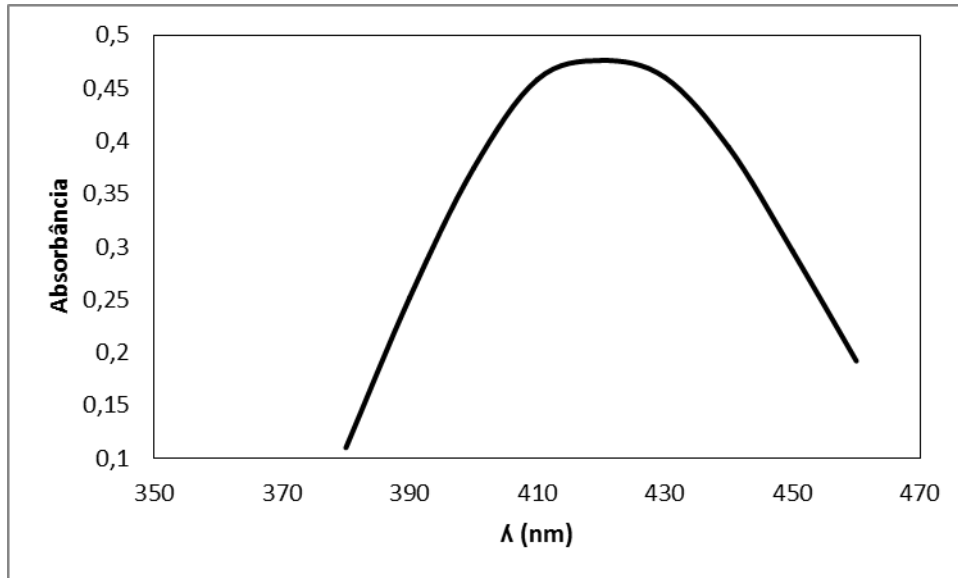


Figura 7: Varredura espectrofotométrica obtida com a solução da substância padrão Rutina na concentração de 5 µg/mL.

A partir das leituras da solução padrão de rutina em diferentes concentrações (5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL, 30 µg/mL, 35 µg/mL e 40 µg/mL), foi obtida a reta de calibração mostrada na figura 8. Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear para determinação da equação da reta e do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), resultando na equação da reta de calibração  $y = 0,0248x + 0,0047$ .

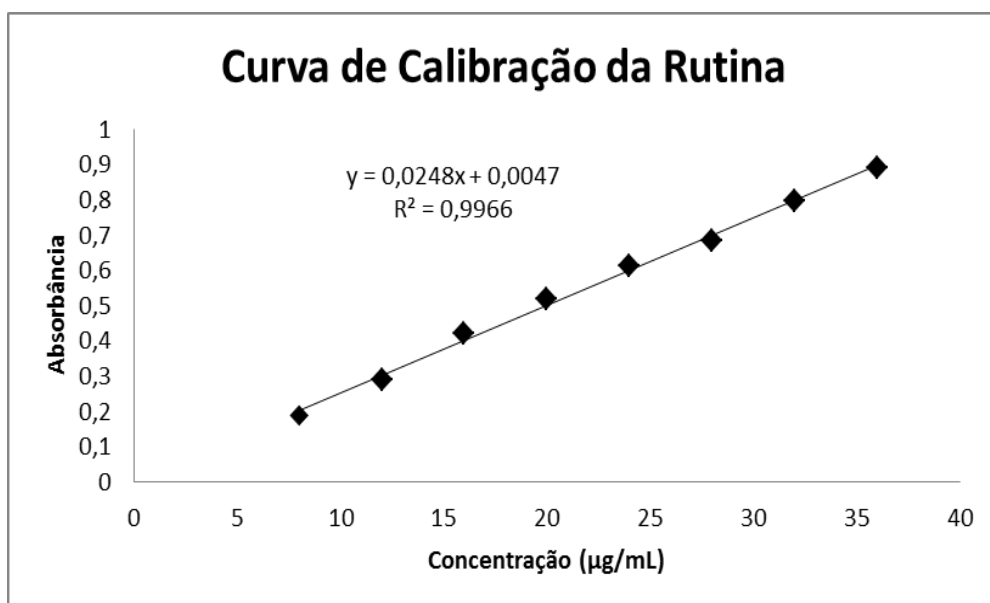


Figura 8: Curva espectrofotométrica obtida com a solução da substância padrão Rutina nas concentrações 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL, 30 µg/mL, 35 µg/mL e 40 µg/mL. Para obtenção da equação da reta.

Os teores de fenóis totais variaram de 2,28 a 21,13 g/100g nas amostras de *Rosmarinus officinalis* (extrato etanólico, frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) testadas (Tabela 5). As frações hexânica e em acetato de etila apresentaram maiores teores de fenóis totais quando comparadas com as demais amostras testadas. A tabela 5 também mostra que os teores de flavonóides totais variaram de 0,43 a 3,11 g/100g no extrato etanólico e nas frações testadas. O extrato etanólico ( $3,11 \pm 0,1$  g/100g) contém maior teor de flavonóides totais equivalentes à rutina. Devido aos teores de fenóis totais e flavonóides, à fração hexânica e o extrato etanólico, respectivamente, foram escolhidos para desenvolver as formulações de enxaguatório bucal.

Tabela 5 – Resultados de Teores de fenóis e flavonóides totais nos extratos e frações de *Rosmarinus officinalis* através de método espectrofotométrico.

<b>Amostras</b>	<b>Fenóis totais (g/100g)</b>	<b>Flavonóides totais (g/100g)</b>
Extrato Etanólico	$10,35 \pm 0,2$	$3,11 \pm 0,1$
Fração Hexânica	$15,94 \pm 0,2$	$0,77 \pm 0,03$
Fração Diclorometânica	$7,45 \pm 0,1$	$0,43 \pm 0,07$
Fração em Acetato de Etila	$21,13 \pm 0,09$	$2,55 \pm 0,06$
Fração Butanólica	$2,28 \pm 0,03$	$0,43 \pm 0,02$

O conteúdo de fenóis totais e flavonóides foram determinados, destacando-se uma maior concentração de fenóis nas frações de polaridades intermediárias (hexânica e em acetato de etila); já em relação aos flavonóides, o extrato etanólico, de maior polaridade, apresentou melhor resultado. A variação dos teores de flavonóides nas amostras testadas pode estar relacionada a uma maior quantidade de flavonóides não glicosilados que são extraídos em solventes menos polares (DEL BANO et al., 2004; ALMEIDA et al., 2010).

Os compostos fenólicos presentes na planta *Rosmarinus officinalis* (LIU et al., 2009; LIN et al., 2010) possuem diferentes propriedades farmacológicas estudadas como, atividade antimicrobiana, antiviral, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, antiplaquetária e antiulcerogênica. Também possuem ação no aumento na permeabilidade capilar, migração de leucócitos e inibição da exudação protéica (PELZER et al., 1998). Estes efeitos podem estar relacionados às propriedades inibitórias que os flavonóides apresentam nos vários sistemas enzimáticos incluindo hidrolases, isomerases, oxigenases, oxidoreduases, polimerases,

fosfatases, proteínas fosfoquinases e aminoácido oxidases (FERGUSON, 2001; OKAMURA et al., 1994; FRANCO et al., 2005; SOUSA et al., 2007).

## 5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM MEIO DE CULTURA SÓLIDO POR TÉCNICA DE DIFUSÃO EM AGAR

A substância padrão de ampicilina foi testada na concentração de 1,0µg/mL para a cepa de *S. mutans* ATCC 25175 (tabela 6), e para a cepa de *C. albicans* ATCC 10231 a substância padrão utilizada foi o Nitrato de Miconazol na concentração de 1,0µg/mL, (tabela 7).

Tanto o extrato etanólico de *R. officinalis* quanto suas frações apresentaram atividade antimicrobiana, como pode ser observado nas figuras 9 e 10 para *S. mutans* ATCC 25175, e nas figuras 11 e 12 para *C. albicans* ATCC 10231.

Tabela 6 – Resultados das medidas dos tamanhos de halos de inibição de crescimento (mm), obtidos em ensaios com extratos de *Rosmarinus officinalis*; nas concentrações de 5 e 10 % testados frente ao *S. mutans* ATCC 25175.

Amostras	Medida dos halos de inibição (mm) ± DP	
	5%	10%
Extrato Etanólico	25 ± 0,2	28 ± 0,1
Fração em Hexano	29 ± 0,06	29 ± 0,1
Fração em Diclorometano	20 ± 0,4	21 ± 0,4
Fração em Acetato de Etila	20 ± 0,3	20 ± 0,2
Fração em Butanol	14 ± 0,3	15 ± 0,2
Ampicilina 1,0µg/mL	30 ± 0,1	30 ± 0,1
DMSO (Dimetilsulfóxido)	Sh	Sh

(Sh) Ausência do halo de inibição de crescimento.

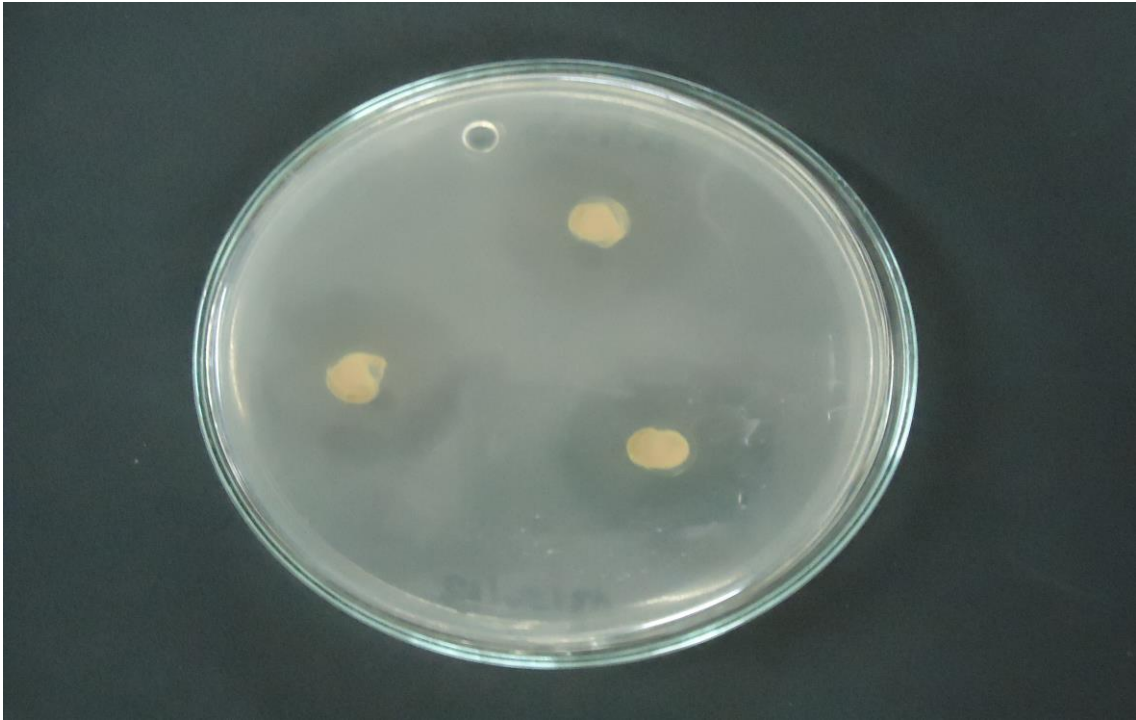


Figura 9 – Halo formado pela inibição do crescimento do *Streptococcus mutans* ATCC 25175, pelo extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis* a 10%, empregando técnica de difusão em ágar.

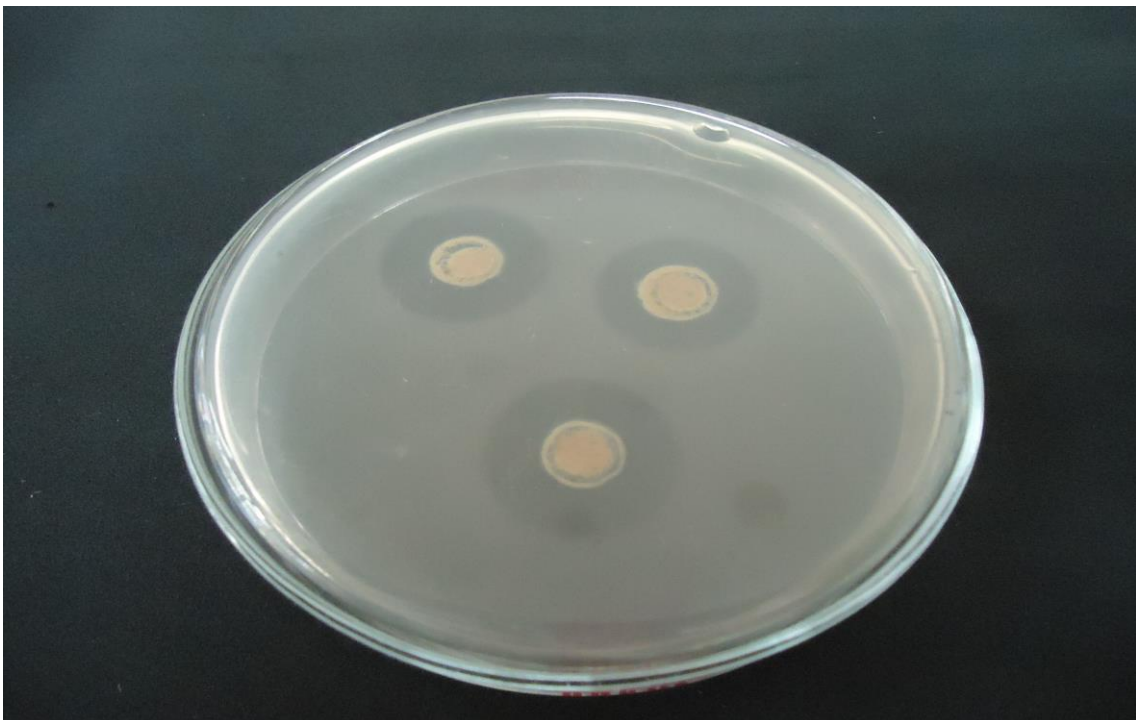


Figura 10: Halo formado pela inibição do crescimento do *Streptococcus mutans* ATCC 25175, pela fração em diclorometano de *Rosmarinus officinalis* a 10%, empregando técnica de difusão em ágar.

Tabela 7 – Resultados das medidas dos tamanhos de halos de inibição de crescimento (mm), obtidos em ensaios com extratos de *Rosmarinus officinalis*; nas concentrações de 5 e 10 % testados frente à *C. albicans* ATCC.

Amostras	Medida dos halos de inibição (mm) $\pm$ DP	
	5%	10%
Extrato Etanólico	7 $\pm$ 0,2	9,9 $\pm$ 0,08
Fração em Hexano	12 $\pm$ 0,2	15 $\pm$ 0,2
Fração em Diclorometano	9,3 $\pm$ 0,1	9,5 $\pm$ 0,4
Fração em Acetato de Etila	5 $\pm$ 0,03	7 $\pm$ 0,2
Fração em Butanol	6 $\pm$ 0,1	10
Nitrato de Miconazol 1,0 $\mu$ g/mL	18 $\pm$ 0,1	18 $\pm$ 0,1
DMSO (Dimetilsulfóxido)	3 $\pm$ 0,1	3 $\pm$ 0,1

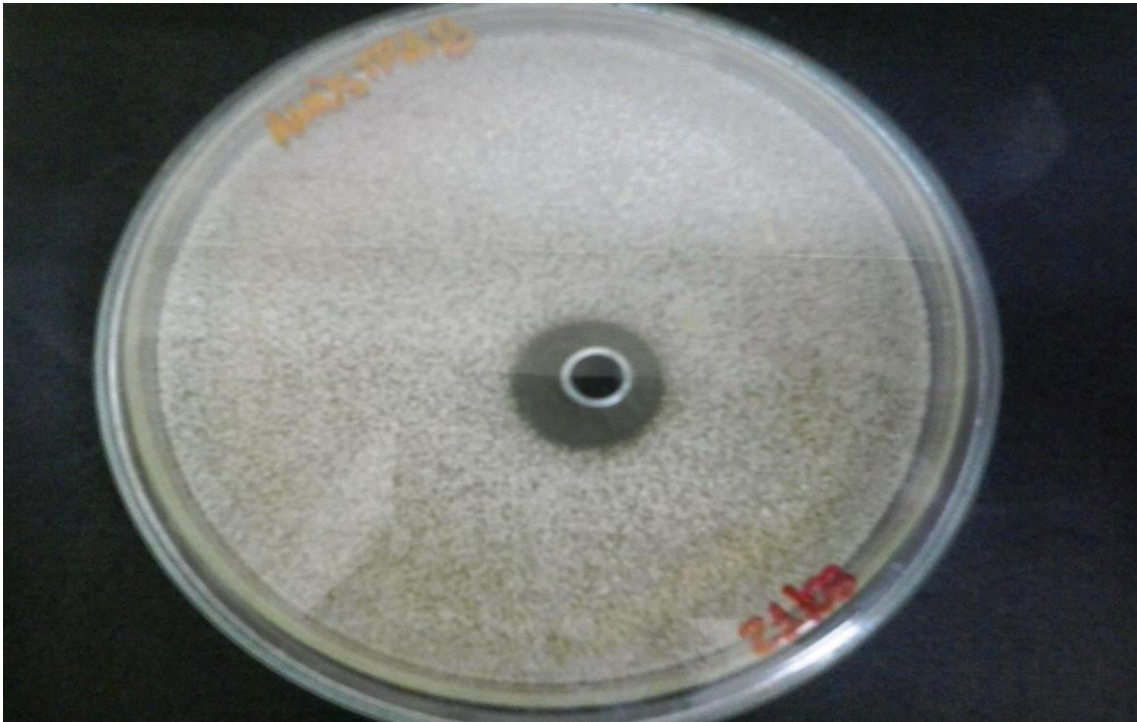


Figura 11 - Halo formado pela inibição do crescimento da *Candida albicans* ATCC 10231, pela fração em diclorometano de *Rosmarinus officinalis* a 5%, empregando técnica de difusão em ágar.

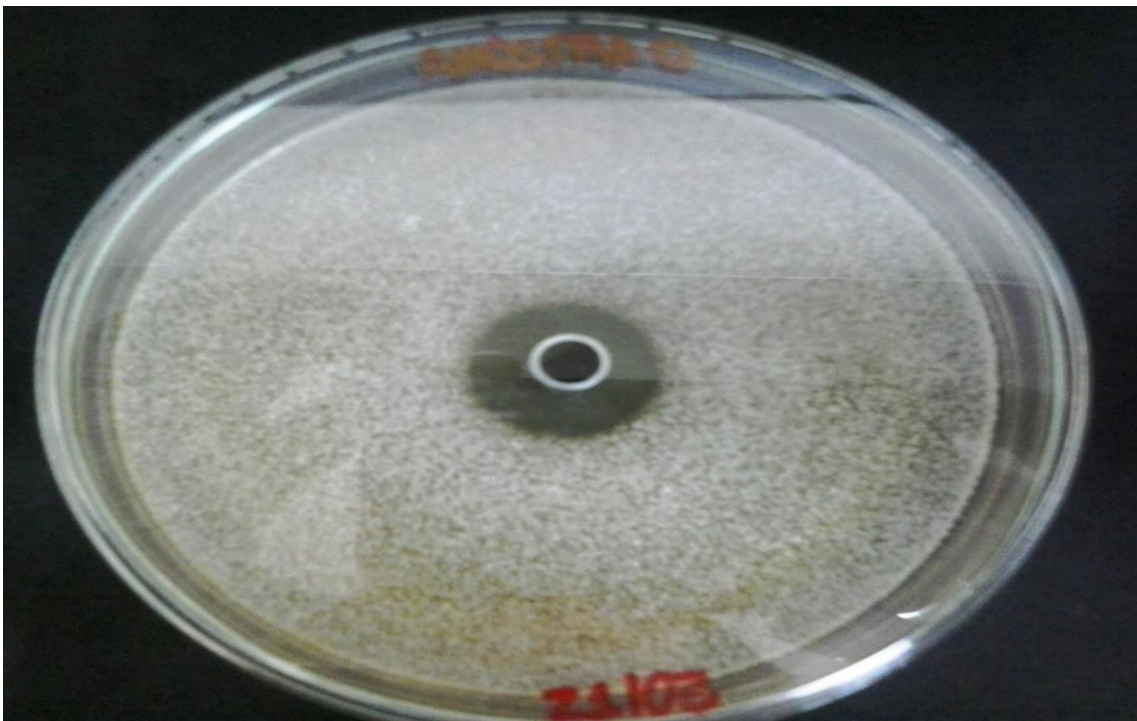


Figura 12 – Halo formado pela inibição do crescimento da *Candida albicans* ATCC 10231, pela fração hexânica de *Rosmarinus officinalis* a 5%, empregando técnica de difusão em ágar.

Os resultados indicaram que as todas as frações de *R. officinalis* foram efetivas em inibir o crescimento de *S. mutans* e *C. albicans* pelo método de difusão, demonstrando atividade antimicrobiana. Esta atividade pode ser atribuída à presença de diversas substâncias nesses produtos, especialmente os constituintes fenólicos (NASCIMENTO et al., 2000; MELÉNDEZ & CAPRILES, 2006).

Foram observados halos de inibição de crescimento bacteriano de 14 a 29 mm de diâmetro; e antifúngico de 5 a 15 mm de diâmetro. A inibição do crescimento apresentou-se homogênea, de acordo com o grau de concentração das amostras de *R. officinalis* (SILVA et al., 2008). Os resultados mostraram que o extrato de alecrim e as suas frações possuem compostos bioativos com atividade antimicrobiana.

Meléndez & Capriles (2006), testaram o extrato metanólico das folhas de *R. officinalis* contra 17 cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas, foi relatada atividade para 10 cepas e os halos de inibição variaram entre 12 e 18 mm. Condizendo com os resultados obtidos neste trabalho. A diferença entre o diâmetro dos halos de inibição pode ser atribuída às diferentes polaridades do líquido extrator utilizado.

Nascimento et al. (2000), testaram o extrato hidro-alcóolico de *R. officinalis* contra a cepa de *Candida albicans* pelo método de difusão em ágar e relataram a suscetibilidade do micro-organismo ao extrato, portanto seus resultados encontram-se de acordo com o presente estudo.

Há estudos na literatura, que relatam atividade antimicrobiana de *Rosmarinus officinalis* para fungos e diversas bactérias como, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Escherichia coli*, *Corinebacterium* e *Pseudomonass fluorescens* (NEWALL et al., 2002; ALONSO, 1998; SILVA et al., 2008; EL OMRI et al., 2010). As atividades antibacteriana e antifúngica foram comprovadas nesta pesquisa com as cepas: *S. mutans* e *C. albicans*, respectivamente.

### 5.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DO EXTRATO E FRAÇÕES DE *R. officinalis* FRENTE A *S. mutans* ATCC 25175 E *C. albicans* ATCC 10231.

Para o extrato etanólico e frações de *R. officinalis* foram obtidas as Concentrações Inibitórias Mínimas. Os resultados foram promissores quando comparados a trabalhos já publicados, visto que para a cepa de *S. mutans*, as CIM variaram de 0,312 mg/mL a 1,25 mg/mL e para a cepa de *C. albicans* de 1,25 mg/mL a 2,5 mg/mL.



A CIM para as diluições de Clorexidina-padrão foi de 12,5 µg/mL e para o Nitrato de Miconazol foi de 0,313 mg/mL. A determinação da CIM do extrato etanólico e frações de *Rosmarinus officinalis* e das substâncias padrões Clorexidina e Miconazol estão expressos na tabela 8.

Tabela 8 - Resultado do teste CIM para extrato etanólico e frações de *Rosmarinus officinalis*, Clorexidina e Nitrato de Miconazol, frente à *S. mutans* ATCC 25175 e *C. albicans* ATCC 10231.

Amostras	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Candida albicans</i>
Extrato Etanólico	0,625 mg/mL	1,25 mg/ML
Fração Hexânica	0,312 mg/mL	1,25 mg/mL
Fração do Diclorometano	0,625 mg/mL	2,5 mg/mL
Fração do Acetato de Etila	0,625 mg/mL	1,25 mg/mL
Fração Butanólica	1,25 mg/mL	1,25 mg/mL
Clorexidina	12,5 µg/mL	---
Nitrato de Miconazol	---	0,312mg/mL

(---) Não se aplica

A presença da atividade antimicrobiana do extrato de *R. officinalis* corrobora o uso popular da planta no tratamento de infecções.

Ao visar uma possível aplicabilidade clínica dos extratos de *R. officinalis* e *S. Cumini* como enxaguatórios bucais ou irrigantes do canal radicular, Costa et al. (2009), utilizaram extratos glicólicos (livres de etanol), os quais se mostraram satisfatórios para atividade antifúngica sobre cepas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*, com CIM de  $20 \pm 7$  mg/mL para *C. albicans*. No entanto o resultado da CIM com o extrato etanólico, testado neste trabalho, apresentou valor de 1,25 mg/mL.

A avaliação da atividade antimicrobiana do extrato metanólico de alecrim realizada por Celiktas et al. (2007), testando *S. aureus*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *K. pneumonia*, *E. faecalis*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *B. subtilis* e *C. albicans*, apresentou concentrações inibitórias mínimas para *C. albicans* variando de 2,5 a 10 mg/mL. No presente trabalho, obteve-se melhores resultados, a CIM para *C. albicans* encontrada variou de 1,25 mg/mL a 2,5 mg/mL.

Em trabalho realizado por Bernardes em 2010, patógenos orais *E. faecalis*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. mutans* e *S. sobrinus*, foram testados frente à substâncias

isoladas do extrato de *R. officinalis*, e a concentração inibitória mínima para *S. mutans* variou de 50 a 400 µg/mL. Em relação à CIM encontrada neste trabalho foram observadas diferenças que podem ser atribuídas às substâncias isoladas do extrato testadas por Bernardes (2010), por isso mais concentradas, logo, as CIM menores.

Há estudos como os de Pintore et al., 2002 e Oluwatuyi et al., 2004 que confirmam as propriedades antimicrobianas de *Rosmarinus officinalis*. Pintore et al., testaram bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*) e Gram negativas (*Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*), e obtiveram resultados de concentração inibitória mínima que variaram de 2,5 a 4,0 mg/mL; já Oluwatuyi et al., testaram o extrato de *R. officinalis* contra a cepa de *Staphylococcus aureus* (MRSA), e as concentrações inibitórias mínimas variaram de 16 a 64µg/mL. Por se tratar de cepas bacterianas diferentes das testadas neste trabalho, os valores das CIM foram diferentes, mas vale ressaltar os bons resultados encontrados por Oluwatuyi et al., que relatou concentrações inibitórias mínimas menores que 100µg/mL.

Angioni et al. (2004), testaram o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* contra as seguintes cepas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Candida albicans*. Para todas as cepas testadas a CIM foi maior que 900 µg/mL. Comparando os resultados apresentados por Angioni et al., com os obtidos neste trabalho, pode-se observar que o óleo essencial de *R. officinalis* foi mais eficaz ao inibir o crescimento microbiano, mesmo com concentrações inibitórias mínimas acima de 900 µg/mL.

#### 5.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ADERÊNCIA (CIMA) DO *S. mutans* ATCC 25175 A UMA SUPERFÍCIE.

Foi realizado o ensaio de CIMA para o extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis* e suas frações, e como substância padrão foi usada a clorexidina. O teste de aderência é definido como a concentração mínima de extrato da planta capaz de inibir a aderência da bactéria ao vidro após determinado período de incubação.

Os resultados de CIMA referentes às diluições das amostras e clorexidina, estão expressos na tabela 9.

O resultado do teste controle mostrou a adesão da massa bacteriana formada aderida ao vidro (Figura 13). No controle negativo, tanto com solução fisiológica (diluyente da Clorexidina) quanto com DMSO (diluyente dos extratos), não ocorreu aderência.

Para o extrato etanólico de *R. officinalis* a menor concentração que impediu a aderência da bactéria *S. mutans* ATCC 25175 ao vidro foi a de 12,5mg/mL. Já para suas frações o resultado foi semelhante, isto é, CIMA de 6,25mg/mL (Figura 14).

Para a Clorexidina a CIMA foi 25 µg/mL, pois na concentração 12,5 µg/mL ocorreu aderência da bactéria ao vidro (Figura 15).

Tabela 9: Resultado da Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) do *S. mutans* ATCC 25175 a uma superfície para extrato etanólico e frações de *Rosmarinus officinalis* e clorexidina.

Amostras	CIMA
Extrato Etanólico	12,5 mg/mL
Fração Hexânica	6,25 mg/mL
Fração do Diclorometano	6,25 mg/mL
Fração do Acetato de Etila	6,25 mg/mL
Fração Butanólica	6,25 mg/mL
Clorexidina	25 µg/mL

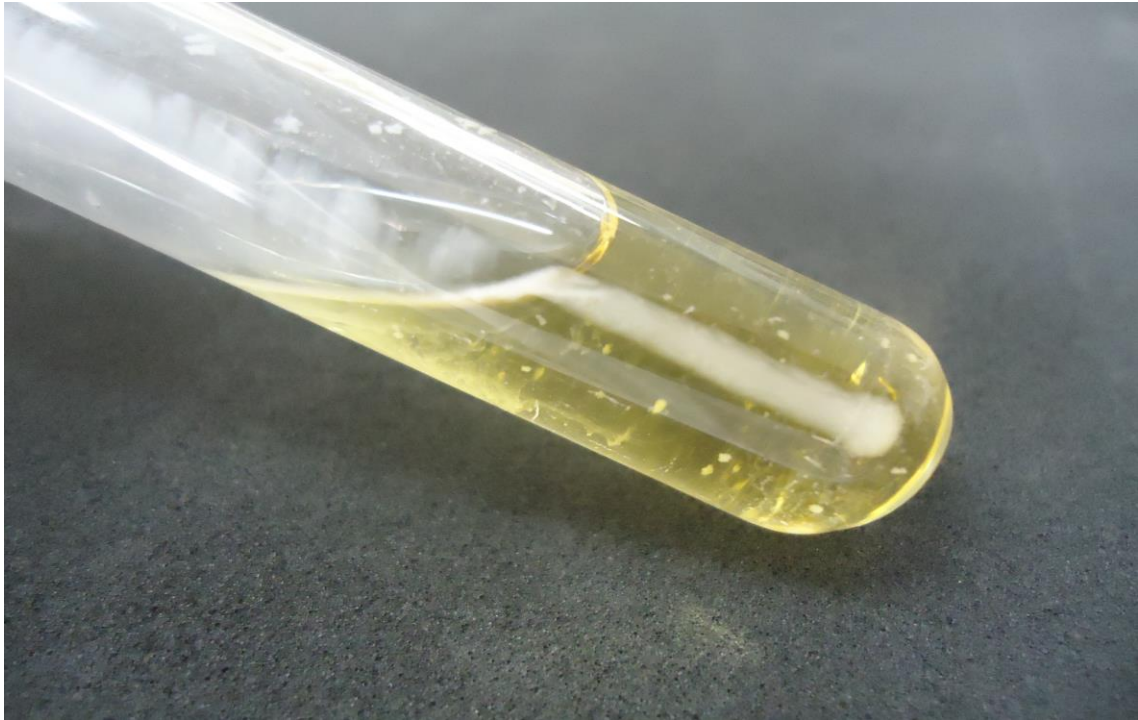


Figura 13: Controle positivo (C+) do teste de CIMA para o *Streptococcus mutans* ATCC 25175. No (C+) observa-se a aderência da massa bacteriana ao vidro.



Figura 14 - Teste de CIMA frente à *S. mutans* ATCC 25175, para a fração em Butanol de *Rosmarinus officinalis*. Concentrações 6,25 mg/mL (lado direito) e 3,12 mg/mL (lado esquerdo). A concentração de 3,12mg/mL apresentou aderência ao vidro.



Figura 15- Teste de CIMA frente à *S. mutans* ATCC 25175, para a Clorexidina. Concentrações 25 µg/mL (lado direito) e 12,5 µg/mL (lado esquerdo). A concentração de 12,5 µg/mL apresentou aderência ao vidro.

Algumas plantas têm sido pesquisadas com o intuito de combater as infecções que acometem a cavidade bucal, principalmente as originadas pela presença do biofilme bacteriano (ALVES et al., 2009; SOARES et al., 2007; FREIRES et al., 2010; SILVA et al., 2012).

Takarada et al. (2010), afirmaram que o óleo essencial de alecrim demonstrou efeito inibitório da aderência de *S. mutans* e atividade inibitória do crescimento de bactérias Gram negativas (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *F. nucleatum*). Foram obtidos resultados para CIMA abaixo de 0,05 mg/mL, resultado melhor do que os encontrados pelo presente trabalho, diferença que pode ser explicada pelo uso do óleo essencial de *R. officinalis*, que apresenta maior concentração de produtos do metabolismo secundário.

Em outro estudo, foi testada a concentração inibitória mínima de aderência do café (*Coffea arabica*) para *S. mutans*, a solução de café fervido a 16% foi a mais efetiva, inibindo 91% da aderência da cepa em relação ao branco (LANDUCCI et al., 2003). Neste trabalho foi observada uma inibição da aderência de 99,6% da clorexidina em relação aos resultados obtidos pelas frações do extrato de *R. officinalis*.

O extrato da casca do caule de *Anacardium occidentale* L., que possui atividade antimicrobiana relatada na literatura (LAURENS et al., 1997), foi testado frente a *S. mitis*, *S. mutans* e *S. sanguis*. O extrato apresentou atividade antibacteriana e o resultado da concentração inibitória mínima de aderência para a cepa de *S. mutans* foi de 0,31 mg/mL, demonstrando maior atividade antiaderente que *R. officinalis* (CIMA 6,25 mg/mL), devido à maior concentração de fenóis em sua composição (MELO et al., 2006).

Alves et al. (2009), testaram três plantas: malva (*Malva sylvestris*), aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* All) e goiabeira (*Psidium guajava* Linn) contra as cepas de bactérias orais patogênicas: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis* e *Lactobacillus casei*. Todos os extratos apresentaram atividade antiaderente, as amostras de malva e aroeira-do-sertão, tiveram atividade semelhante à da clorexidina, CIMA de 0,25 mg/mL. Os extratos testados por Alves et al., possuem boa atividade antiaderente, mas a concentração inibitória mínima de aderência diverge com a encontrada pelo presente trabalho para a clorexidina, que foi de 25 µg/mL.

As plantas Aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius*) e Arnica (*Solidago microglossa*), foram testadas por Freires et al. (2010), frente às cepas de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*. Os resultados encontrados foram, Aroeira, CIMA de 0,892 mg/mL e Arnica de 17,85 mg/mL. A Aroeira apresentou resultados mais satisfatórios, visto que a CIMA do controle positivo (clorexidina) foi de 0,171 mg/mL. Os resultados publicados por Freires et al., mostram que a Aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius*) possui maior atividade antiaderente do que *Rosmarinus officinalis* (CIMA 12,5 mg/mL), mas os resultados para a clorexidina foram diferentes dos encontrados por este trabalho.

##### 5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ENXAGUATÓRIO BUCAL CONTENDO *ROSMARINUS OFFICINALIS* PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR.

São características importantes dos agentes ativos dos enxaguatórios bucais: redução da adesividade das bactérias à superfície dental, inibição do crescimento e proliferação dos microrganismos, inibição da formação da matriz intercelular da placa, modificação da bioquímica bacteriana, com a finalidade de reduzir a formação de produtos citotóxicos e modificação da ecologia do biofilme para desenvolvimento de uma flora menos patogênica (MOREIRA et al., 2001).

Atualmente, há uma preocupação para a remoção do etanol dos enxaguatórios bucais, de modo que muitas empresas estão produzindo enxaguatórios livres desta substância (CARRETERO et al., 2006).

O extrato de *R. officinalis* possui atividade antimicrobiana, sendo viável sua utilização para preparação de antissépticos orais (CORDEIRO et al., 2006).

O conservante benzoato de sódio foi utilizado na concentração de 0,1%. Este apresenta propriedades tanto bacteriostáticas como antifúngicas. A ação conservante pode ser aumentada pela adição de propilenoglicol a 15%, cuja concentração possui, além de ação antimicrobiana, propriedades umectantes, estabilizantes, e de co-solvente miscível na água. Constitui também num carreador para emulsificantes e veículo para flavorizantes, preferencialmente ao etanol, pois impede a volatilização e fornece um aroma mais estável. O óleo essencial de menta foi adicionado para conferir sabor e aroma à formulação (ZANIN et al., 2007).

O sal sódico do ácido edético (EDTA) foi usado como quelante e sequestrante de íons alcalinos. Uma pequena quantidade de sacarina sódica foi adicionada (0,1%), pois apresenta boa solubilidade na água, fornecendo gosto agradável ao enxaguatório bucal. O hidróxido de sódio foi utilizado como agente alcalinizante e tamponante com a finalidade de estabilizar o pH da formulação (ROWE, SHESKEY e WELLER, 2003).

O extrato etanólico de *R. officinalis* e sua fração hexânica, foram as amostras que apresentaram maior atividade antimicrobiana no teste de difusão em ágar, definindo as formulações de enxaguatórios bucais a serem avaliadas.

Foram testadas formulações com a Concentração Inibitória Mínima do extrato etanólico (0,1%) e da fração hexânica (0,05%) e a 5 e 10% (ZANIN et al., 2007; PRISTA et al., 2003), tanto para a cepa de *S. mutans* ATCC 25175, quanto para *C. albicans* ATCC 10231.

Os testes foram realizados em triplicata tendo em cada placa uma única solução-teste.

A base foi utilizada como controle do teste, com ausência do extrato *R. officinalis*. Os resultados das medidas dos halos de inibição de crescimento microbiano para as formulações contendo extrato etanólico de *R. officinalis* (amostras de A a I), encontram-se na tabela 10 e para as formulações contendo a fração hexânica (amostras de J a R), encontram-se na tabela 11.

Foi observado que todas as amostras de enxaguatórios bucais que continham extrato de *R. officinalis*, aumentaram a atividade antimicrobiana quando comparadas aos brancos (enxaguatório base sem extrato). Em destaque para a amostra E (extrato etanólico de *R. officinalis* 5% + fluoreto de sódio 0,05%), testada frente a *S. mutans*, que apresentou um

aumento em relação ao branco de 16 mm (59,3%) no diâmetro do halo de inibição. Para os enxaguatórios contendo a fração hexânica, a amostra N (fração hexânica de *R. officinalis* 5% + fluoreto de sódio 0,05%) apresentou um aumento de 50% no diâmetro do halo de inibição (10 mm).

Para a cepa de *C. albicans* a amostra C (extrato etanólico de *R. officinalis* 10%) apresentou um aumento em relação ao branco de 10 mm no diâmetro do halo de inibição (100%). E para as amostras que continham a fração hexânica, L (fração hexânica de *R. officinalis* 10%) apresentou um aumento de 130% no diâmetro do halo de inibição (13 mm).

Para melhor visualização dos resultados, as figuras 16 e 17 são referentes às formulações que contém extrato etanólico em sua composição; já as figuras 18 e 19 se referem às que contém a fração hexânica.

As formulações com 5 e 10% de extrato de *R. officinalis*, apresentaram melhores resultados em relação ao branco, porém a incorporação da amostra ao enxaguatório não foi de fácil realização. Como não foi empregado etanol para solubilização do extrato, somente propilenoglicol, o que dificultou a incorporação de grande quantidade de extrato.

Em relação à fração hexânica, além de seu rendimento ser menor, sua incorporação também é deficiente, visto que não foi utilizado hexano para solubilização e que essa fração não é facilmente dissolvida em propilenoglicol. Por isso a formulação escolhida para ser desenvolvida foi a amostra A (Figura 20), que é composta pela Concentração Inibitória Mínima do extrato etanólico de *R. officinalis*, que apresentou alto rendimento, com fácil incorporação à formulação e resultados satisfatórios frente a *S. mutans* e *C. albicans*.



Tabela 10: Resultados das medidas dos tamanhos de halos de inibição de crescimento (mm), obtidos em ensaios com enxaguatórios bucais com extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis*; nas concentrações de 0,1, 5 e 10 % testados frente ao *S. mutans* ATCC 25175 e *C. albicans* ATCC 10231.

Enxaguatório	Medida dos halos de inibição (mm) $\pm$ DP	
	<i>S. mutans</i>	<i>C. albicans</i>
A	29 $\pm$ 0,2	15 $\pm$ 0,1
B	30 $\pm$ 0,2	17 $\pm$ 0,2
C	31 $\pm$ 0,1	20 $\pm$ 0,2
D	30 $\pm$ 0,4	20 $\pm$ 0,1
E	43 $\pm$ 0,2	18 $\pm$ 0,2
F	36 $\pm$ 0,4	19 $\pm$ 0,05
G	29 $\pm$ 0,5	16 $\pm$ 0,1
H	38 $\pm$ 0,3	15 $\pm$ 0,05
I	40 $\pm$ 0,1	20 $\pm$ 0,08
BRANCO A, B, C	20 $\pm$ 0,3	10 $\pm$ 0,1
BRANCO D, E, F	27 $\pm$ 0,5	16 $\pm$ 0,05
BRANCO G, H, I	28 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,3

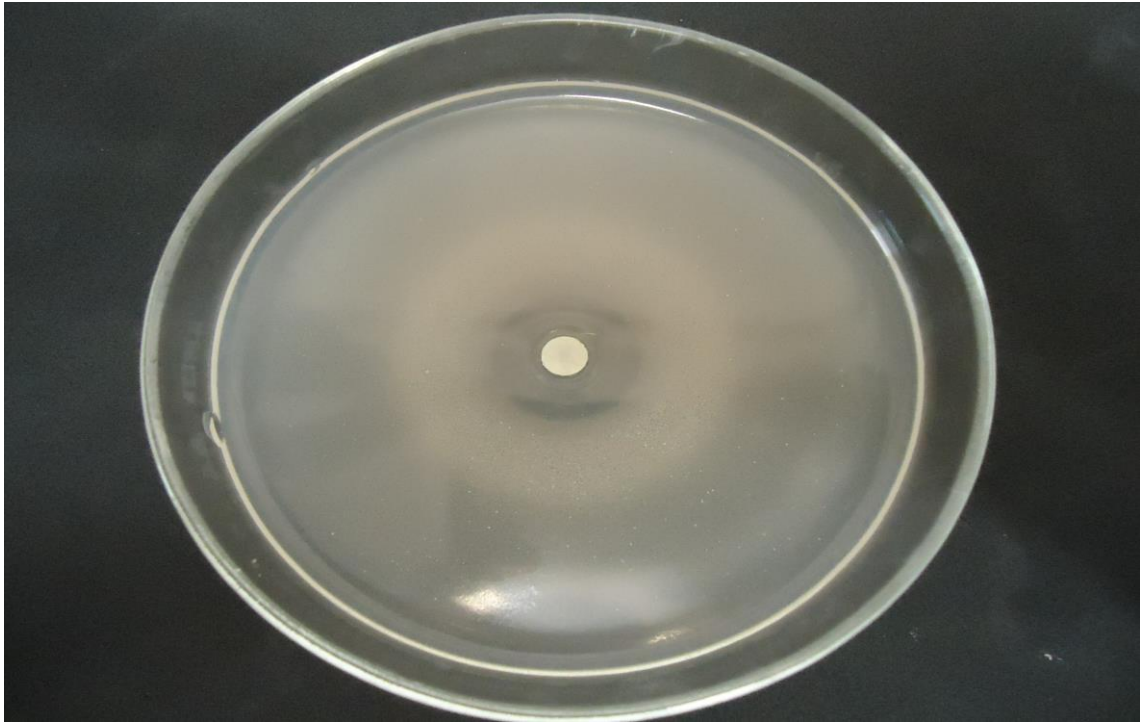


Figura 16 - Halo formado pela inibição do crescimento do *Streptococcus mutans* ATCC 25175, pelo enxaguatório bucal com extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis* a 0,1% e Clorexidina a 0,12%, empregando técnica de difusão em ágar.



Figura 17 - Halo formado pela inibição do crescimento da *Candida albicans* ATCC 10231, pelo enxaguatório bucal com extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis* a 0,1% e Fluoreto de Sódio a 0,05%, empregando técnica de difusão em ágar.

Tabela 11: Resultados das medidas dos tamanhos de halos de inibição de crescimento (mm), obtidos em ensaios com enxaguatórios bucais com a fração hexânica de *Rosmarinus officinalis*; nas concentrações de 0,1, 5 e 10 % testados frente ao *S. mutans* ATCC 25175 e *C. albicans* ATCC 10231.

Enxaguatório	Medida dos halos de inibição (mm) $\pm$ DP	
	<i>S. mutans</i>	<i>C. albicans</i>
J	25 $\pm$ 0,5	14 $\pm$ 0,08
K	27 $\pm$ 0,2	18 $\pm$ 0,2
L	28 $\pm$ 0,3	23 $\pm$ 0,5
M	29 $\pm$ 0,2	19 $\pm$ 0,1
N	30 $\pm$ 0,5	21 $\pm$ 0,08
O	28 $\pm$ 0,4	24 $\pm$ 0,4
P	26 $\pm$ 0,6	15 $\pm$ 0,1
Q	25 $\pm$ 0,2	19 $\pm$ 0,09
R	24 $\pm$ 0,3	22 $\pm$ 0,4
BRANCO J, K, L	20 $\pm$ 0,2	10 $\pm$ 0,1
BRANCO M, N, O	20 $\pm$ 0,2	16 $\pm$ 0,05
BRANCO P, Q, R	22 $\pm$ 0,2	14 $\pm$ 0,3

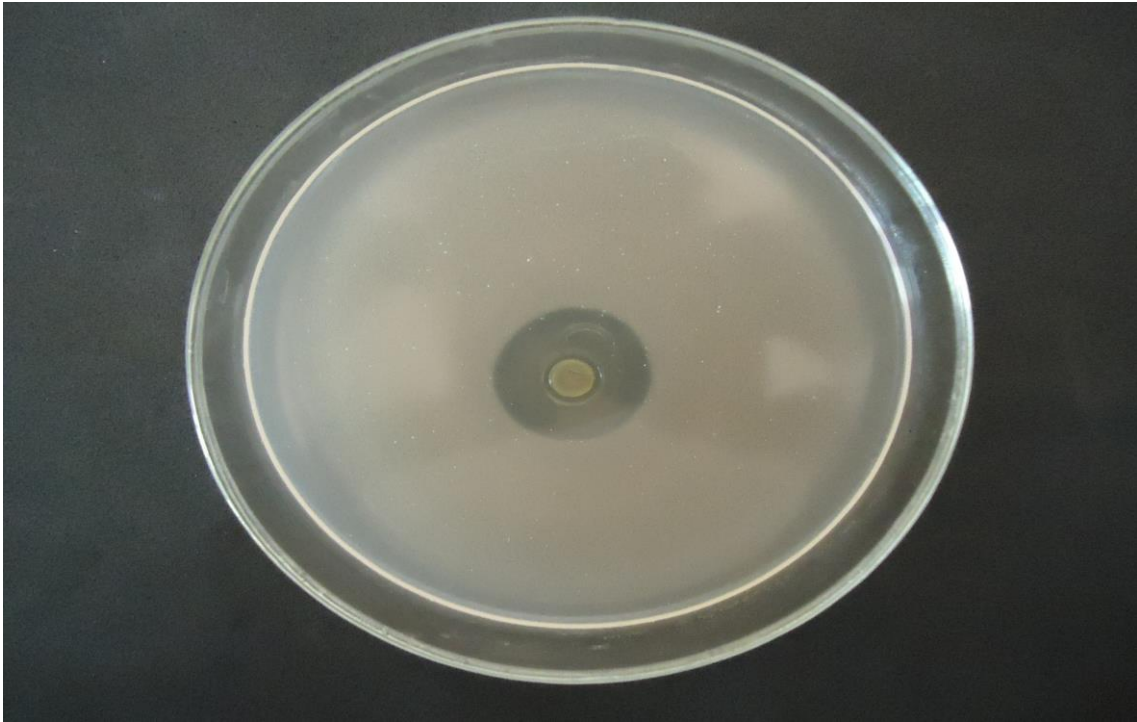


Figura 18 - Halo formado pela inibição do crescimento da *Streptococcus mutans* ATCC 25175, pelo enxaguatório bucal com a fração hexânica de *Rosmarinus officinalis* a 0,05%, empregando técnica de difusão em ágar.

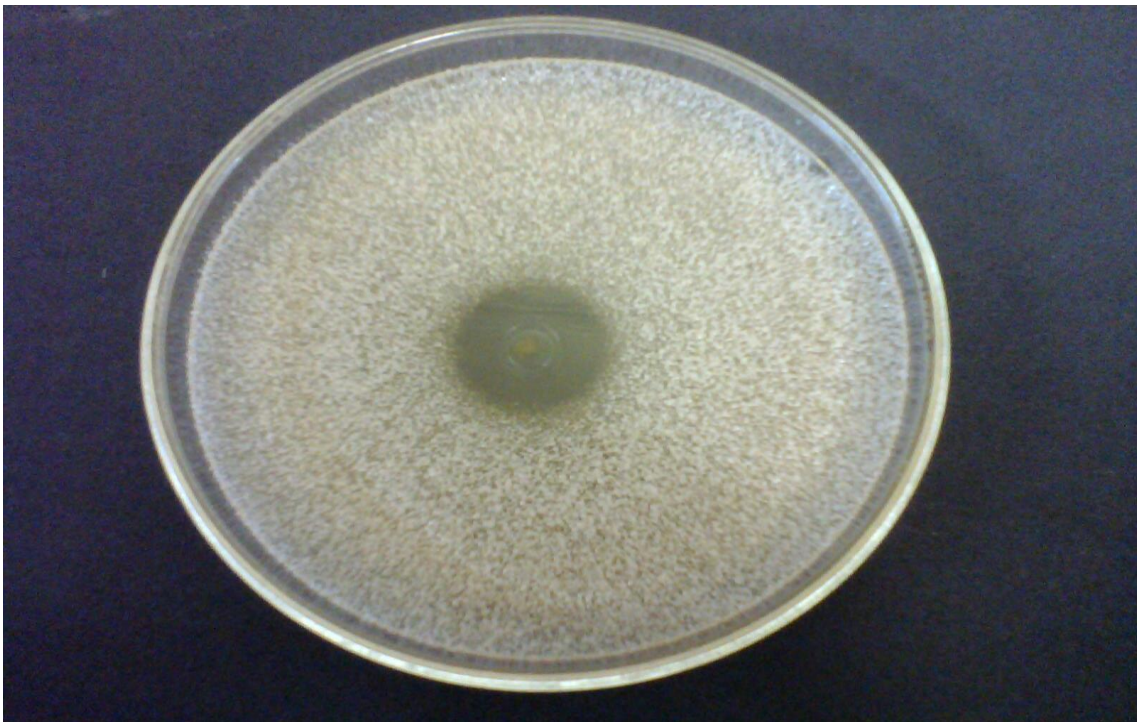


Figura 19 - Halo formado pela inibição do crescimento da *Candida albicans* ATCC 10231, pelo enxaguatório bucal com a fração hexânica de *Rosmarinus officinalis* a 0,05% e Fluoreto de Sódio a 0,05%, empregando técnica de difusão em ágar.



Figura 20: Fotografia do enxaguatório bucal com 0,1% do extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis*.

Cordeiro et al., (2006), desenvolveram uma formulação de enxaguatório bucal, contendo, em associação extratos hidroalcoólicos de *Rosmarinus officinalis* (Alecrim), *Plantago major* (Tanchagem), *Tebebuia impetiginosa* (Ipê-roxo), *Achillea millefolium* (Mil-folhas) e *Nasturtium officinale* (Agrião). A formulação (contendo ou não extratos vegetais) foi testada frente às seguintes cepas: *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *E. fecalis*. Os enxaguatórios apresentaram atividade, porém não foi observada diferença significativa entre as formulações que continham ou não extratos vegetais. Resultado diferente do encontrado por este trabalho, onde as formulações que continham os extratos apresentaram sinergismo com a base do enxaguatório.

Nascimento et al., (2000) propuseram a associação entre antibióticos e extratos vegetais, sobre bactérias resistentes, indicando a ocorrência de sinergismo, possibilitando que

antibióticos ineficazes apresentassem ação contra bactérias. Confirmando os resultados obtidos, em que a associação entre extratos de *R. officinalis* e fluoreto de sódio ou clorexidina aumentou a ação do enxaguatório proposto.

O estudo realizado por Maekawa et al., (2010) avaliou a atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais, à base de clorexidina, sem álcool na sua composição, sobre *Candida albicans*. Dois enxaguatórios bucais sem etanol em sua composição foram analisados: Cariax®, formulado com digluconato de clorexidina 0,12% e fluoreto de sódio 0,05% e Orthokin®, composto por digluconato de clorexidina 0,06% e fluoreto de sódio 0,05% e acetato de zinco 0,34%, em comparação a um enxaguatório com etanol, o Periogard®, à base de digluconato de clorexidina 0,12%, que foi utilizado como controle positivo. Como resultados obtiveram que o Cariax® apresentou atividade fungicida sobre *C. albicans* semelhante à do Periogard®, mas menor ação fungistática em comparação ao controle; notou-se, também que o Orthokin® apresentou apenas ação fungistática semelhante ao Periogard® sobre os isolados avaliados. Tanto as formulações que continham somente extrato de *R. officinalis*; extrato e fluoreto de sódio; e extrato e clorexidina, testadas no presente trabalho apresentaram atividades bactericida e fungicida.

De-Carli et al., (2010) em um ensaio clínico duplo cego randomizado, testaram o sinergismo entre o extrato etanólico de Própolis (*Apis mellifera*) a 5% e o fluoreto de sódio sobre o acúmulo do biofilme dental. Onde a associação da própolis ao fluoreto aumentou as propriedades anticárie do flúor através de sinergismo químico, reduzindo a formação do biofilme e a virulência de *Streptococcus mutans*, sem alterar a microflora residente. O sinergismo químico pode ser justificado pela interação com os flavonóides presentes na amostra. O mesmo efeito sinérgico foi observado com o extrato etanólico e frações de *R. officinalis* com o fluoreto de sódio e clorexidina.

Corroborando com os trabalhos citados, nossos resultados demonstraram atividades antimicrobiana, antiaderente e sinérgica para o extrato e frações de *R. officinalis* testados.

## 6 CONCLUSÃO

A planta medicinal *Rosmarinus officinalis* possui atividade antimicrobiana frente às cepas padrões de *S. mutans* ATCC 25175 e *C. albicans* ATCC 10231, nas concentrações de 5 e 10%.

O extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis* e suas frações apresentaram atividade antiaderente contra a cepa padrão de *S. mutans* ATCC 25175, nas concentrações de 12,5 e 6,25 mg/mL.

A formulação do enxaguatório bucal contendo extrato etanólico de *R. officinalis* proposta neste trabalho mostrou ter potencial antimicrobiano frente à cepa padrão de *S. mutans* ATCC 25175 e *C. albicans* ATCC 10231.

A presença de fluoreto de sódio na concentração de 0,05% e de clorexidina a 0,12% indicou sinergismo quando em associação com o extrato e frações de *R. officinalis* nas concentrações de 0,01, 5 e 10%.

Mais estudos precisam ser desenvolvidos para aperfeiçoar a formulação e sua relação com a sua eficácia e estabilidade.

## **7 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Os resultados obtidos permitiram abrir novas propostas de trabalho, tais como:

Executar os ensaios de atividade antimicrobiana e aderência microbiana para micro-organismos isolados de pacientes. Essa proposta já se encontra aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos, sobre o número 09143813.0.0000.5147.

Executar ensaios de atividade e eficácia com a formulação do enxaguatório bucal em pacientes acometidos por cárie e biofilme dental.

Melhorar a aparência visual da formulação, acrescentando ativos que confirmam transparência ao produto, sem afetar sua atividade.

Testar a estabilidade do enxaguatório bucal proposto.



## REFERÊNCIAS

- AHAMADY, K.; MARSH, P. D.; NEWMAN, H. N.; BULMAN, J. S.. Distribuitons of *S. mutans* and *S. sobrinus* at sub-sites in human approximal dental plaque. **Caries Res**, v. 27, n. 2, p. 135-139, 1993.
- ALBUQUERQUE, A.C.L.; PEREIRA, M.S.V.; PEREIRA, J.V.; COSTA, M.R.M.; PEREIRA, L.F.; HIGINO, J.S.. Efeito antimicrobiano do extrato de *Matricaria recutita* Linn. (Camomila) sobre microrganismos do biofilme dental. **Pesq. Bras. Odontopediatria e Clínica Integrada, Universidade Federal da Paraíba**, vol.10, n.3, p.451-455, 2010.
- ALMEIDA, D. M.; CHAVES, L. L.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; PINHO, J. J. R. G.; YAMAMOTO, C. H.; SOUSA, O. V. Teores de óleo essencial e flavonoides totais em amostras de *Rosmarinus officinalis* L. **Rev. Bras. Farm.**, v. 91, n. 4, p. 170-175, 2010.
- ALMEIDA, P. F.; FRANCA, M. P.; SANTOS, S. P.; MOREIRA, R. S.; TUNES, U. R. Streptococci microbiota associated with initial formation of dental plaque. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 33-41, 2002.
- ALONSO JUNIOR, R. *Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas*. Buenos Aires: Isis Ediciones. SRL, p. 1039, 1998.
- ALVARENGA, A.L.; SCHWAN, R.F.; DIAS, D.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; BRAVO-MARTINS,C.E.C. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 9, n.4, p. 86-91, 2007.
- ALVES, P. M.; QUEIROZ, L. M. G.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica in vitro de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 222-224, 2009.
- ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. 1ª ed., New York: CRC Press, 2005.
- ANGIONI, A.; BARRA, A.; CERETI, E.; BARILE, D.; COISSON, 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 *Rosmarinus officinalis* L. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 11, p. 3530-3532, 2004.
- ARAÚJO, P. W. B.; QUITANS JÚNIOR, L. J.; VASCONCELOS, H. D.; ALMEIDA, J. R. S. Flavonóides e hipertensão. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 12, n. 3, p.188-189, 2005.
- ASSADORIAN, J.. CDHA position paper on commercially available over-the-counter oral rinsing products. *Canadian Journal of dental hygiene (CJDH)*, v. 40, n. 4, p. 01-13, 2006.
- BARBOSA, V.L.S.A.; NÓBREGA, D.R.M.; CAVALCANTI, A.L.. Estudo bibliométrico de pesquisas realizadas com fitoterápicos na odontologia. **Rev. Bras. Cien. Saúde** v. 16, n. 2, p. 123-130, 2012.

BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS, K. C. P.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 1, p. 258-285, 2006.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade : fonte potencial para descoberta de fármacos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARROS, L. M.; FIORINI, J. E. Efeito da clorexidina e da água ozonizada sobre os *S. viridans* da placa bacteriana supragengival. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent**, v. 54, p. 47-52, 2000.

BARROSO, G. M.. **Sistemática de angiospermas no Brasil**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, v. 3, p. 98-118, 1986.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, Washington, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BENDAZZOLI, W.S. Fitomedicamentos: perspectivas de resgate de uma terapia histórica. **Mundo saúde**; São Paulo, v.24, n.2, p.123-126, 2000.

BERNARDES, W. A.; LUCARINI, R.; TOZATTI, M. G.; SOUZA, M. G. M.; SILVA, M. L. A.; FILHO, A. A. S.; MARTINS, C. H. G.; CROTTI, A. E. M.; PAULETTI, P. M.; GROppo, M.; CUNHA, W. R. Antimicrobial Activity of *Rosmarinus officinalis* against Oral Pathogens: Relevance of Carnosic Acid and Carnosol. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, p.1835-1840, 2010.

BISSET, N.G. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals - A handbook for practice on a scientific bases. **Stuttgart: CRC Press**, London. Medpharm,1994.

BLUMENTHAL, M. et al. **The Complete German Commission E Monographs: therapeutic guide to herbal medicines**, American Botanical Council, United States of America, 1ª ed., 1998.

BOIX, Y. F.; VICTÓRIO, C. P.; LAGE, C. L. S.; KUSTER, R. M. Volatile compounds from *Rosmarinus officinalis* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC. Growing in southeast coast of Brazil. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 255-257, 2010.

BRASIL, Congresso Nacional. **Lei no. 9.782, de 26 de janeiro de 1999**. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. DOU. Diário Oficial da União, Poder Legislativo, Brasília, DF, 27 jan. 1999.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada no. 48 de 16 de março de 2004**. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápico junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. DOU. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar. 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada no. 17 de 16 de abril de 2010**. Dispõe sobre as Boas Práticas de

Fabricação de Medicamentos. DOU. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília, 19 de abril de 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta Pública nº 14 de 14 de Maio de 2013**. Proposta de Instrução Normativa que determina a publicação da "Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado" e a "Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado". Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a5beee004fa126df932cf79a71dcc661/Consulta+P%C3%BAblica+n+14+SECOL.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 04 de Julho de 2013.

BUER, C. S.; IMIN, N.; DJORDJEVIC, M. A. Flavonoids: new roles for old molecules. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, n. 1, p. 98-111, 2010.

BUGNO, A.; BUZZO, A. A.; NAKAMURA, C. T.; PEREIRA, T. C.; MATOS, D.; PINTO, T. J. A.. Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais. **Rev Bras Cien Farmac**, v. 41, p. 491-497, 2006.

CARRETERO-PELÁEZ, M.A.; ESPARZA-GÓMEZ, G.C.; FIGUERO-RUIZ, E.; CERERO-LAPIEDRA, R. Alcohol-containing mouthwashes and oral cancer. Critical analysis of literature. **Med Oral**. v. 9, p. 116, 2006.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S.. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 18, n. 2, p.314-319, 2008.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ª ed., Porto Alegre/Florianópolis, Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. UFSC, p. 443-459, 2000.

CARVALHO JUNIOR, R. N. **Obtenção de extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por extração supercrítica**: determinação do rendimento global, de parâmetros cinéticos e de equilíbrio e outras variáveis do processo. 2004. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CELIK TAS, O.Y., BEDIR, E.; SUKAN, F.V. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chem.**, v. 101, n. 4, p. 1457, 2007.

CHENG, L.; WEIR, M. D.; ZHANG, K.; WU, E. J.; XU, S. M.; ZHOU, X.; XU, H. H. K. Dental plaque microcosm biofilm behavior on calcium phosphate nanocomposite with quaternary ammonium. **Dental Materials**, v. 28, n. 8, p. 853-862, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE(CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard-8thed., M07-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2009.

COSTA, A. C. B. P.; PEREIRA, C. A.; FREIRE, F.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium*

*cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. **Rev. de Odontologia da UNESP** v. 38, n. 2, p. 111-116, 2009.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.1, 1031p., 1994.

CORDEIRO, C. H. G.; SACRAMENTO, L. V. S.; CORREA, M. A.; PIZZOLITTO, A. C.; BAUAB, T. M. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. **Rev. Bras. Ciências Farmacêuticas** v. 42, n. 3, p. 395-404, 2006.

CORRÊA JÚNIOR, C; MING, L. C.; SCHEFFER M. C. Cultivo de Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas. FUNEP, Jaboticabal, 1994.

CURY, J. A.. Controle químico da placa dental. In: Kringer, L.(coord). **Promoção de Saúde Bucal**. São Paulo: ABOPREV/ Artes Médicas, cap. 7, p.131-140, 1997.

DE-CARLI, A. D.; ZÁRATE-PEREIRA, P.; DE-CARLI, G.; J. ZAFALON, E.; ZÁRETE, C. B. R.; YASSUMOTO, L. M. Ação da Própolis de *Apis mellifera* Associada ao Fluoreto de Sódio Sobre o Biofilme Dental: Ensaio Clínico Duplo Cego Randomizado. **Rev Odontol Bras Central**, n. 19, p. 310-313, 2010.

DEL-BANO, M. J.; LORENTE, J.; CASTILLO, J. *et al.* Flavonoid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots *Rosmarinus officinalis*. Postulation of a biosynthetic pathway. **J. Agric. Food Chem**, v. 52, p. 4987-4992, 2000.

DELLACASSA, E.; LORENZO, D.; MOYNA, P.; FRIZZO, C. D.; ATTI-SERAFINI, L.; DUGO, P. *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae) essential oils from the South of Brazil and Uruguay. **Journal of Essential Oils Research**, v. 11, n. 1, p. 27-30, 1999.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3ª ed., New York: Wiley, 2009. 507p.

DIAS, A. A. e Colaboradores. **Saúde bucal coletiva: metodologia de trabalho e práticas**. 1ª edição. SP: Santos, p.102 - 106, p. 114 - 115, p. 161 - 168, 2006.

DI STASI, L.C., HIRUMA-LIMA C.A.. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2.ed. São Paulo: Editora Unesp, 2002.

DITTERICH, R.G., PORTERO, P.P., WAMBIER, D.S., PILATTI, G.L., SANTOS, F.A. Higiene bucal e motivação no controle do biofilme dental. **Odontologia. Clín.Científ**, v. 6, n. 2, p. 123 -128, 2007.

DUARTE, M. C. T.. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multiciência**, n. 7, 2006.

EL OMRI, A.; HAN, J.; YAMADA, P.; KAWADA, K.; ABDREBBAH, M.B.; ISODA, H. *Rosmarinus officinalis* polyphenols activate cholinergic activities in PC12 cells through phosphorylation of ERK1/2. **J Ethnopharmacol**, v. 131, p. 451–458, 2010.

ETO, Fábio Shigueo; RASLAN, Suzane A.; CORTELLI, José Roberto. Características microbianas na saúde e doença periodontal. *Revista de Biociências*.v.9(2): 45-51. 2003.

FARAG, R.S., DAW, Z.Y., HEWEDI, F.M., EL-BAROTY, G.S.A. Antimicrobial activity of some egyptian spice essential oils. **Journal of Food Protection**,v. 52, n. 9, p. 665-667, 1989.

FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research.**, v. 475, p. 89-111, 2001.

F'GUYER, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 19, n. 2, p. 56-72, 2003.

FIGUEIREDO, Neusa Lindorosa Loureiro. Efeito inibitório de extractos de plantas no crescimento e factores de virulência de *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus Mutans*. 2009. Dissertação (Mestrado em Bioquímica).- Unviversidade de Lisboa. Lisboa. 2009. Disponível em: <[http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/3326/1/ulfc095744\\_tm\\_neusa\\_figueiredo.pdf](http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/3326/1/ulfc095744_tm_neusa_figueiredo.pdf)>.

FIGUEREDO, C.R.L.V.; PINTO, L.P.; LINS, R.D.A.U.; GODOY, G.P.; MEDEIROS, K.B.; ALVES, R.D. Aspectos clínicos patológicos e etiopatogenéticos da doença periodontal: considerações atuais. **Rev. Bras. Odontol.**, Rio de Janeiro, v. 59, n. 4, p. 243-246, 2002.

FRANCO, J. **Prospecção fitoquímica e análise química e microbiológica do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Muell ex. Benth., Myrtaceae**, Dissertação, Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p. 71, 2005.

FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; KINSELLA, J. E. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. **Lancet**, v. 341, n. 8852, p. 1103-1104, 1993.

FREIRE, M. C. M.; SOARES, F. F.; PEREIRA, M. F. Conhecimentos sobre a saúde dental, dieta e higiene bucal de crianças atendidas pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás. **J. Bras. Odontopediatr.**, v. 5, p. 195-199, 2002.

FREIRES, I. A.; ALVES, L. A.; JOVITO, V. C.; ALMEIDA, L. F. D.; CASTRO, R. D.; PADILHA, W. W. N. Atividades antibacteriana e antiaderente in vitro de tinturas de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) e *Solidago microglossa* (Arnica) frente a bactérias formadoras do biofilme dentário. **Odontol. Clín.-Cient. (Online)**, v. 9, n. 2, 2010. Disponível em <[http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid = S167738882010000200010&lng=pt&nrm=iso](http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S167738882010000200010&lng=pt&nrm=iso)>. acesso em 17 maio 2013.

FREITAS, A. G.; COSTA, V.; FARIAS, E. T. N.; LIMA, M. C. A. de; XIMENES, E. A. Atividade antiestafilocócica do *Plantago major* L. In: **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Recife: Universidade Federal de Pernambuco, UFPE,v. 16, p. 265, 2000.  
FUNDAÇÃO ZOOBOTÂNICA DO RIO GRANDE DO SUL. **Guia do Jardim Botânico de Porto Alegre**. Porto Alegre: Jardim Botânico de Porto Alegre, p. 100, 2005.

GALLI, A., FRANZETTI, L., BRIGUGLIO, D. In vitro antimicrobial activity of essential oil and extracts of spices used in foods. **Industrie Alimentari**, v. 24, n. 277, p. 463-466, 1985.

- GARCIA, E. S.; SILVA, A. C. P.; GILBERT, B.; CORRÊA, C. B. V.; CAVALHEIRO, M. V. S.; SANTOS, R. R.; TOMASSINI, T.. **Fitoterápicos**. Cap. 10. Disponível em: [<http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap10/eloi.html>]. Acesso em: 20 nov. 2009.
- GARIB, D. G.; UNGARO, A. E.; HENRIQUES, J. F. C.; BASTOS, J. R. M. Efeito do uso do gluconato de clorexidina e do cloreto de cetilpiridínio, em bochechos, como meio complementar da higiene bucal em pacientes sob tratamento ortodôntico. **Ortodontia**, v. 30, n. 2, p. 22-30, 1997.
- 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, p. 251-256, 1996.
- GEBRAN, M. P.; GEBERT, A. P. O. Controle químico e mecânico de placa bacteriana. **Tuiuti: Ciência e Cultura**, n. 26, p. 45-58, 2002.
- GIUGNOLININI, L. **In Erbe Secondo Natura. Secondo Natura: Laboratorio Grafico**, Vignate, Milano, v. 4, 1985.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo dos metabólitos secundários. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GOLD, P. E.; CAHILL, L.; WENK, G. L. *Ginkgo biloba*: A Cognitive Enhancer? **Psych. Sci. Publ. Int.** v. 3, p. 2-11, 2002.
- GROPPO, F. C.; *et al.* Use of phytotherapy in dentistry. **Phytotherapy Research**. United States, v. 22, p. 993-998, 2008.
- HEINZMANN, B. M.; BARROS, F. M. C. Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo *Lippia alba* (mill.)N. E. Brown (Verbenaceae). **Saúde**, v. 33, n. 1, p. 43-48, 2007.
- HERNANDEZ, N. E.; TERESCHUK M. L.; ABDALA, L. R. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi del Valle (Tucuman, Argentina). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1-2, p. 317-322, 2000.
- HERTWING, I.F.. **Plantas Medicinais e Aromáticas: plantio, colheita, secagem e comercialização**. 2 ed. São Paulo: Editora Ícone, 1991.
- HÖFLING, J. F.; SPOLIDÓRIO, D. M. P.; PEREIRA, C. V.; ROSA, E. A. R.; MOREIRA, D. Presença de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus mutans* associado a *Streptococcus sobrinus* em escolares de diferentes classes sócio-econômicas e sua relação com a atividade cariogênica dessas populações. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v. 13, n. 2, p. 173-180, 1999.
- JARDIM, P. S.; JARDIM, E. G. J. Influência da remoção mecânica da placa bacteriana associada ao uso diário de solução fluoretada. **RGO**, v. 46, n.2, p.79-84, 1998.
- JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 11ªed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, p. 777, 1993.

JUNIOR, V. F. V.; MARIA, A. C. P.; MACIEL, A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

KATHAWALA, F. G. Analogs of mevalolactone and derivatives thereof, processes for their production, pharmaceutical compositions containing them and their use as pharmaceuticals. **WHO** pat. 84 82131, 1984.

LANDUCCI, L. F.; OLIVEIRA, L. D.; BRANDÃO, E. H. S.; KOGA-ITO, C. Y.; JARDIM JUNIOR, E. G.; JORGE, A. O. C. Efeitos de *Coffea arabica* sobre a aderência de *Streptococcus mutans* à superfície de vidro. **Cienc Odontol Bras**, v. 6, n. 3, p. 58-64, 2003.

LAURENS, A.; FOURNEAU, C.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; BORIES, C.; LOISEAU, P. M. Antivectorial Activities of Cashew Nut Shell Extracts from *Anacardium occidentale* L. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 2, p. 145-146, 1997.

LOESCHE, W. J. **Cárie dental**, uma infecção tratável. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1993.

LIN, C.W.; WU, M.J.; LIU, .IY.; SU, J.D.; YEN, J.H. Neurotrophic and cytoprotective action of luteolin in PC12 cells through ERK-dependent induction of Nrf2-driven HO-1 expression. **J Agric Food Chem**, v. 58, p. 4477–4486, 2010.

LINDHE, J. KARRING T., LANG P. N. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 4ª edição. RJ: Guanabara Koogan, p. 437 – 443, 2005.

LIU, R.; GAO, M.; QIANG, G.F.; ZHANG, T.T.; LAN, X.; YING, J.; DU, G.H. The anti-amnesic effect of luteolin against amyloid b25–35 peptide induced toxicity in mice involve the protection of the neurovascular unit. **Neuroscience**, v. 162, p. 1232–1243, 2009.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A. C.; HENZEL, A.; WITT, N. M.. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, v. 35, n.2, p. 371-376, 2005.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAEKAWA L. E.; BRIGHENTI, F. L.; LAMPING R.; OLIVEIRA L. D.; MARCACCI, S.; KOGA-ITO, C. Y.. Atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais sem álcool à base de clorexidina sobre *Candida albicans*. **Rev Odontol UNESP**, v. 39, p. 15-19, 2010.

MARCHIORI, Vanderlí F. *Rosmarinus officinalis*. 2004. Monografia (Fitomedicina) - Fundação Herbarium. Associação Argentina de Fitomedicina. Argentina, 2004. Disponível em:  
[http://www.plantasmedicinales.org/archivos/rosmarinus\\_officinalis\\_romero\\_\\_\\_monografia.pdf](http://www.plantasmedicinales.org/archivos/rosmarinus_officinalis_romero___monografia.pdf)  
f. Acesso em: 30 maio 2013.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas Mediciniais**, Viçosa: UFV, 2000.

MELÉNDEZ, P. A.; CAPRILES, V. A. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. **Phytomedicine**, v. 13, p. 272-276, 2006.

MELO, A. F. M.; SANTOS, E. J. V.; SOUZA, L. F. C.; CARVALHO, A. A. T.; PEREIRA, M. S. V.; HIGINO, J. S. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Anacardium occidentale* L. sobre espécies de Streptococcus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n. 2, p. 202-205, 2006.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 405-411, 2005.

MONTEIRO, A. M. D.; ARAÚJO, R. P. C.; GOMES FILHO, I. S.. Diabetes Mellitus tipo 2 e doença periodontal. **Rev. Gaúcha Odontol.**, v. 50, n. 1, p. 50-54, 2002.

MOREIRA, A.N., *et al.* Agentes antimicrobianos no controle da placa supragengival parte I. **Arquivos em Odontologia**. Brasil, v. 37, p. 87-98, 2001.

NASCIMENTO, J. E. et al. Produtos à base de Plantas Medicinais comercializados em Pernambuco - Nordeste do Brasil. **Acta Farm. Bonaerense** v. 24, n. 1, p. 113-122, 2005.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicalson antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 247-256, 2000.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. A.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JUNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C. Antimicrobial activity of the essentials oils: a multifactor approach of the methods. *Rev. Bras. Farmacogn.*, João Pessoa, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

NEWMAN, M. G.; TAKEI, H. H.; KLOKKEVOLD, P. R.; CARRANZA, F. A. **Periodontia Clínica**, 10ª ed., Ed. Elsevier, 2007.

NEWALL, C.A.; ANDERSON, L.A.; PHILIPSON, J.D. Plantas medicinais: guia para profissional de saúde. **São Paulo: Premier**, 2002.

NIKOLIC, K. M. Theoretical study of phenolic antioxidants properties in reaction with oxygen-centered radicals. **Journal of Molecular Structure**, v. 774, n. 1-3, p. 95-105, 2006.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.; HOORN, D. E. C.; BOELEN, P. G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 4, p. 418-425, 2001.

NOVACOSK, R.; TORRES, R. S. L. A. Atividade antimicrobiana sinérgica entre óleos essenciais de Lavanda (*Lavandula officinalis*), Melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), Cedro (*Juniperus virginiana*), Tomilho (*Thymus vulgaris*) e Cravo (*Eugenia caryophyllata*). **Revista Analytica**, n.21, p. 36-38, 2006.

OLIVEIRA, D.C.; ROSELL, F. L.; SAMPAIO, J. E. C.; RODRIGUES JUNIOR, A. L. Redução do índice de placa com Listerine: avaliação do índice de placa em relação ao uso de



Listerine e/ou escovação. **Rev. Gaúcha Odontol.** Porto Alegre, v. 46, n. 2, p.101-104, 107-108, 1998.

OKAMURA, N.; HARAGUCHI, H.; HASHIMOTO, K. *et al.* Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. **Phytochemistry**, v. 37, p. 1463-1466, 1994.

OLUWATUYI, M.; KAATZ, G. W.; GIBBONS, S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 3249–3254, 2004.

ONWUKAEME, N. D. Anti-inflammatory activities of flavonoids of *Baphia nitida* Lodd. (Leguminosae) on mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, n. 2, p. 121–124, 1995.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação antimicrobiana de produtos de origem natural. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 17, n. 1, p. 102-107, 2007.

PELZER, E. L. *et al.* Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. **Farmacoo.**, v. 53, p. 421-424, 1998.

PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V.; SAMPAIO, F. C.; SAMPAIO, M. C. C.; ALVES, P. M.; ARAUJO, C. R. F.; HIGINO, J. S. Efeito antibacteriano e antiaderente in vitro do extrato da *Púnica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.16, p. 88-93, 2006.

PEREIRA, R. C.; OLIVEIRA, M. T. R.; LEMOS, G. C. S. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes - RJ. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 14, n. 01, p. 37-40, 2004.

PERES, D. H. D. F. Prevalência dos *Streptococcus* do grupo *mutans* (Egm) em crianças de 8 a 60 meses nas creches da cidade de Joinville - SC. **J. Bras Odontopediat Odontol Bebê** v. 6, p. 36-40, 2003.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-42, 2000.

PINTORE, G.; USAI, M.; BRADESI, P.; JULIANO, C.; BOATTO, G.; TOMI, F.; CHESSA, M.; CERRI, R.; CASANOVA, J. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour Fragr. J.*, v. 17, p. 15-19, 2002.

PINTO, V.G. **Saúde Bucal Coletiva**. 5ª.edição. Santos, p. 466, 2008.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 2, p. 193-210, 2001.

PRINS, C.L.; LEMOS, C.S.L.; FREITAS, S.P. Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) **Rev Bras PI Med.**, v.8, n.4, p. 92-95, 2006.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 9, p. 786, 2003.

RAMIREZ-AMADOR, V.; SILVERMAN Jr., S.; MAYER P. *et al.* Candidal colonization and oral candidiasis in patients undergoing oral and pharyngeal radiation therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 84, n. 2, p. 149-153, 1997.

REY, L. **Dicionário de termos técnicos de Medicina e Saúde**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.825, 1999.

RIBEIRO, D. S.; MELO, D. B.; GUIMARÃES, A. G.; VELOZO, E. S. Evaluation of the rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) as modulator of bacterial resistance. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 687-696, 2012.

ROBINSON, R.; **The Structural Relations of Natural Products**, Clarendon Press: Oxford, 1991.

RODRIGUES JÚNIOR, A.L. Redução do índice de placa com listerine. Avaliação do índice de placa em relação ao uso de listerine e/ou escovação. **RGO** v. 46, p. 101-108, 1998.

ROSA, P.C.A.; MAIA, L.A.; GALLO, S.M. Prevenção e tratamento da saúde bucal com planta medicinal da Amazônia. **XIX Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA – CNPq/FAPEAM**, Manaus, 2010.

ROTH, B. D.; SLISKOVIC, D. R.; TRIVEDI, B. K. Chapter 16. Treatment of Hypercholesterolemia. **Annual Reports in Medicinal Chemistry**. v.24, p. 147-156, 1989.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; WELLER, P.J. **Handbook of pharmaceutical excipients**. Great Britain: Pharmaceutical Press. 4ed. p. 776, 2003.

RUBIRA, I.R.F. *Pesquisa de bactérias bucais em amostras de placa subgengival de indivíduos com periodonto normal e de portadores de periodontite através da técnica do "Slot Immunoblot"*. [Tese de Doutorado, Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru]. p. 113,1993.

SADER, H. S.; PIGNATARI, A. C.; HOLLINS, R. J.; LEME, I.; JONES, R. N. Oxacilin and quinolone resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brazil: a multicenter molecular epidemiology study. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 14, n. 5, p. 260-264, 1993.

SCHARDONG, R.M.F. & CERVI, A.C. Estudos etnobotânicos das plantas de uso medicinal e místico na comunidade de São Benedito, Bairro São Francisco, Campo Grande, MS, Brasil. **Acta. Biol. Parana.**, v. 29: 187-217, 2000.

SHAN, B.; CAI, Yi-Z.; BROOKS, J. D.; CORKE, H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. **International Journal of Food Microbiology**, Rome, v. 117, n. 1, p. 112-119, 2007.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**. v. 61, p. 1053–1071, 1998.

SILVA, I. C. G.; BEZERRA, L. M. D.; FERREIRA, G. L. S.; CASTRO, R.D. Atividade antifúngica do eugenol associado a antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Candida albicans*. **Rev ICO**, v. 10, n. 2, 2012.

SILVA, A. S.; SILVA, G. A.; CORREA, V. M.; PIVA, R. M.; WERNECK, R. I. Controle mecânico do biofilme dental. **Revista Gestão & Saúde**, v. 2, n. 2, p. 1-6, 2011.

SILVA, M.S.A.; SILVA, M.A.R.; HIGINO, J.S.; PEREIRA, M.S.V.; CARVALHO, A.A.T. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. Sobre bactérias orais planctônicas. **Rev Bras Farmacog** v.18, n.2, João Pessoa, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STHEMANN, J.R. Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul. 3º ed. Porto Alegre: Editora Universidade UFRGS, 1995.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.;MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. Porto Alegre: editora UFRGS, 2007.

SOARES, D. G. S.; OLIVEIRA, C. B.; LEAL, C.; DRUMOND, M. R. S.; PADILHA, W. W. N. Atividade Antibacteriana *in vitro* da Tintura de Aroeira (*Schinus terebinthifolius*) na Descontaminação de Escovas Dentais Contaminadas pelo *S. mutans*. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 7, n. 3, 2007.

SOBRINHO, T. J. S. P.; SILVA, C. H. T. P.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 683-689, 2008.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JUNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, J. M. E. Utilização de ervas medicinais. **Portal Educação**. 2010. <http://www.portaleducacao.com.br/farmacia/artigos/9675/utilizacao-de-ervas-medicinais>. Acesso em 26 de Junho de 2013.

SOUZA, T.M.P.; CONCEIÇÃO,D.M. Atividade antibacteriana do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) **Ensaio e Ciência**, v. 5, n. 5, 2007.

SPOLIDORIO, D. M. P.; SPOLIDORIO, L. C.; BARBEIRO, R. H.; HÖFLING, J. F.; BERNARDO, W. L. C.; PAVAN, S. Avaliação quantitativa de *Streptococcus* do grupo *mutans* e *Candida sp* e fatores salivares na cavidade bucal de pacientes submetidos à radioterapia. **Pesqui Odontol Bras**, v. 15, n. 4, p. 354-358, out./dez. 2001.

STEFANI, C. M.; LIMA, A. F. M. Avaliação dos efeitos clínicos da aplicação de gel de clorexidina em pacientes sob tratamento ortodôntico. **Rev Periodontia** v. 5, p. 300-305, 1996.

SÜLSEN, V. P.; CAZORLA, S. I.; FRANK, F. M.; REDKO, F. C.; ANESINI, C. A.; COUSSIO, J. D.; MALCHIODI, E. L.; MARTINO, V. S.; MUSCHIETTI, L. V. Trypanocidal and Leishmanicidal activities of Flavonoids from Argentine Medicinal Plants. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 4, p.654-659, 2007.

SWERTS, M. S. O.; DIAS COSTA, A. M. D.; FIORINI, J. E. Efeito da solução associada de clorexidina e própolis na inibição da aderência de *Streptococcus spp.* **Rev Int Periodontia Clin**; n. 2, p. 6-10, 2005.

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 Microbiology and Immunology**, v. 19, n. 1, p. 61-64, 2010.

TAPAS, A. R.; SAKARKAR, D. M.; KAKDE, R. B. Flavonoids as nutraceuticals: a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 3, p. 1089-1099, 2008.

TEBALDI, V. M. R. *Análise e potencial de uso de óleos essenciais no controle de Pseudomonas sp. e na formação de biofilme por Pseudomonas aeruginosa*. 2008. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. **Herbarium - Compêndio de Fitoterapia**. 3 ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1995.

TREVIZANI, L.M.M. **Efeito do gel dentifrício formulado com extratos vegetais em doenças periodontais**. [Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista], p.103, 2002.

TRESSINO, E.S.; GABRIEL, K.C. Estudo das aplicações farmacológicas do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) **Infarma**, v.21, n.3/4, p. 44-48, 2009.

TROTTER, R., LOGAN, M.. **Informant consensus: a new approach for identifying potentially effective medicinal plants**. Indigenous Medicine and Diet: Biobehavioural Approaches, Redgrave, p. 91-112, 1986.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Natural resources conservation service. Coleus Lour**. Disponível em : <http://www.plants.usda.gov/java/nameSearch>. Acesso em 29 de Março de 2012.

VEIGA JR. V. F.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VENNAT, B.; GROSS, D.; POURRAT, H. *Hamamelis virginiana*: identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, v. 67, n. 1, p. 11-14, 1992.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. **Phenolic compound biochemistry**. 1ª ed., New York: Springer, 2007.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIGO-SCHULTZ, S. C. EVALUATION OF THE RESISTANCE INDUCTION ON THE CONTROL COMMON BACTERIAL BLIGHT IN SNAP BEAN. Botucatu, 2008. 88 p. Tese (Doutorado em Agronomia/ Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. General guideline for methodologies on research and evaluation of tradicional medicine. Geneva, 2000. (WHO/ EDM/ TRM/ 2000.1).

WILSON, T.G.; KORNMAN, K.S. **Fundamentos de Periodontia**. São Paulo: Quintessence Editora, p. 564, 2001.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid Biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiology**, v. 126, n. 2, p. 485-493, 2001.

YUNES R. A.; CALIXTO J.B. **Plantas medicinais - sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Ed. Argos: Chapecó, 1ªed., cap. 1, 2001.

ZAGO, J. A. A.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; JUNIOR, A. F.. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, p. 828-833, 2009.

ZANIN, S.M.W.; MIGUEL, M.D.; BARREIRA, S.M.W.; NAKASHIMA, T.; CURY, C.D.; COSTA, C.K. Enxaguatório Bucal: principais ativos e desenvolvimento de fórmula contendo extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.8, n.1, 2007.