

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum americanum* E *Ocimum basilicum* SOBRE PERIODONTOPATÓGENOS

Antimicrobial activity of essential oil of *Ocimum americanum* and *Ocimum basilicum* against periodontopathogens

Paulo José Lima Juiz¹, Franceli da Silva¹, Mario Julio Avila Campos², Ana Paula Trovatti Uetanabaro³, Reinaldo José Campos Alves⁴, Angélica Maria Lucchese⁵.

¹ Professor Adjunto, UFRB, Babia, Brasil.

² Professor Titular ICB-USP, São Paulo, Brasil.

³ Professora Adjunto, UESC, Babia, Brasil.

⁴ Biólogo, Mestrado em Modelagem em ciências da terra e do ambiente, Laboratório de Taxonomia Vegetal, UEFS, Babia, Brasil.

⁵ Professora Titular, UEFS, Babia, Brasil.

Recebimento: 07/05/16 - Correção: 05/07/16- Aceite: 05/08/16

RESUMO

Na doença periodontal, a resposta imune ao desafio microbiano resulta em ativação de osteoclastos e reabsorção do osso alveolar, culminando com a perda do dente. Deste modo, a busca por compostos com atividade antimicrobiana torna-se relevante no controle da formação do biofilme dental. Com o crescente aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos, o descobrimento de novas drogas seria uma ferramenta útil e neste cenário as plantas medicinais são alternativas promissoras. No presente estudo a atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de folhas e flores de *Ocimum americanum* e *Ocimum basilicum* foi avaliada frente aos periodontopatógenos *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43717), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) e frente ao micro-organismo *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285). O método de macrodiluição em tubos foi utilizado para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Foram registrados menores valores de CIM (0,00625 mg.mL⁻¹ a 0,0125 mg.mL⁻¹) frente a bactéria *P. gingivalis*, sendo os maiores valores (<3,2 mg.mL⁻¹) registrados para *A. actinomycetemcomitans*. Estas concentrações foram consideradas bactericidas quando a CBM foi avaliada. A composição química dos óleos mostrou a presença de linalol e metil cinamato, compostos com reconhecida atividade antimicrobiana, o que poderia explicar os resultados encontrados. Este trabalho mostrou que as plantas medicinais do gênero *Ocimum* estudadas foram capazes de inibir o crescimento microbiano, especialmente de *P. gingivalis*, apresentando, portanto, potencial biotecnológico para uso na área de odontologia.

UNITERMOS: óleo essencial, *Ocimum*, atividade antimicrobiana, periodontopatógenos. R Periodontia 2016; 26: 07-14.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as patologias mais comuns na cavidade bucal encontra-se a doença periodontal (Lindhe, 1999). Existem evidências que relacionam as doenças periodontais como possíveis fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Shoji *et al.*, 2011), acidente vascular cerebral (Wu *et al.*, 2000), infecções pulmonares (Macedo *et al.*,

2010), nascimento de bebês com baixo peso (Ercan *et al.*, 2013), desenvolvimento de tumores orais e gástricos (Plaza *et al.*, 2016), o que torna a doença periodontal um importante problema de saúde pública.

O processo inflamatório na doença periodontal é desencadeado e perpetuado por periodontopatógenos que são bactérias anaeróbias Gram-negativas, como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*,

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Treponema denticola* e *Eikenella corrodens* que colonizam o biofilme dental subgingival (Darveau *et al.*, 1997).

A bactéria *Porphyromonas gingivalis* pertence ao gênero *Porphyromonas*, família Bacteroidaceae. É um coco-bacilo Gram-negativo anaeróbico estrito, imóvel e não formador de esporos (Cardoso Jorge, 2007; Shoji *et al.*, 2011). Algumas cepas de *Porphyromonas gingivalis* possuem a capacidade de invadir e infectar o epitélio oral e células musculares lisas, bem como alterar a função de células endoteliais (Dolgilevich *et al.*, 2011).

Além disso, é descrito que a gingipaina Rs, uma arginina-cisteína protease produzida por *P. gingivalis* tem a capacidade de inibir o sistema imune, degradar tecidos, sendo também considerada uma potente ativadora do sistema de coagulação, estimulando a agregação plaquetária e ativação dos fatores de coagulação II, IX e X. Esta característica associada a uma intensa resposta inflamatória decorrente da bacteremia contribui para o desenvolvimento de aterosclerose e trombose, como consequência da periodontite crônica (Skottrup *et al.*, 2011).

Dentre os periodontopatógenos de importância clínica, destaca-se também a bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, anteriormente conhecida como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, um micro-organismo Gram-negativo, membro da família Pasteurellaceae, de forma cocobacilar, capnófilico, imóvel e não formador de esporos. Seu principal fator de virulência é a leucotoxina A (LtxA), que possui capacidade de lisar neutrófilos, monócitos e linfócitos T (Cardoso Jorge, 2007), também foram descritos bacteriocinas, fator inibidor de quimiotaxia, collagenases, proteases para imunoglobulina G (IgG), fímbrias (O'Brien Simpson *et al.*, 2004).

Diversas proteínas participam da patogenicidade do *A. actinomycetemcomitans*. As genotoxinas CdtA, CdtB, CdtC podem induzir uma parada do ciclo celular na fase G2 e apoptose em células do sistema imune (Guerra *et al.*, 2011 *apud* Zijngje *et al.*, 2012). A invasão em células do epitélio gengival é mediada pela Omp29 (Kajiji *et al.*, 2011) e Segundo Maeda *et al.* (2009) a proteína inflamatória de macrófagos (MIP) está envolvida na sobrevivência intracelular deste patógeno e tem sido estudada como candidata a formulação de vacina antimeningocócica (Hung *et al.*, 2011 *apud* Zijngje *et al.*, 2012).

O periodontopatógeno *Fusobacterium nucleatum*, filo *Fusobacteria*, família Fusobacteriaceae, é um bastonete Gram-negativo anaeróbico, comensal, com extremidades afiladas, conferindo-lhe a forma de fuso, não formam esporos e são

imóveis, são numericamente dominantes no biofilme dental e importantes em doenças infecciosas no homem (Cardoso Jorge, 2007).

O *F. nucleatum* é um dos primeiros micro-organismos a colonizar o biofilme dental, sendo uma espécie com papel central na interação entre bactérias Gram-positivas (*Streptococcus* e *Actinomyces*, reconhecidas como colonizadores iniciais do biofilme pela capacidade de adesão a película adquirida) e Gram-negativas (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, reconhecidas como colonizadoras tardias) (Merrit *et al.*, 2009; Ahn *et al.* 2016).

Segundo Jewett *et al.* (2000), a bactéria *F. nucleatum* tem a capacidade de induzir apoptose em polimorfonucleares (via Fas e TNF-R) e linfócitos (Kaplan *et al.*, 2010) favorecendo a colonização do biofilme dental por outras espécies bacterianas. É um patógeno identificado em infecções extraorais em sítios como: sangue, cérebro, pulmão, fígado, articulações e infecções abdominais, ginecológicas e obstétricas (Karpathy *et al.*, 2007) e segundo Mendes *et al.* (2016) modula a resposta imune mediada por células endoteliais, o que pode contribuir com o desenvolvimento de doenças sistêmicas relacionadas a este patógeno.

O procedimento clínico mais usado para tratar a doença periodontal e/ou limitar os danos causados pela destruição óssea alveolar é a raspagem e alisamento radicular, associado ao uso de antimicrobianos, porém pesquisas (Ardila *et al.*, 2010; Japoni *et al.*, 2011) relatam resistência dos periodontopatógenos aos antibióticos. Embora com resultados comprovados, o antisséptico a base de gluconato de clorexidina, largamente utilizado para controle de crescimento do biofilme dental, apresenta efeitos adversos que comprometem o seu uso por períodos prolongados (Mandel, 1994). Neste contexto, o uso de plantas medicinais poderia ser relevante no tratamento da doença periodontal.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial extraído de folhas e flores de *Ocimum americanum* e *Ocimum basilicum* frente aos periodontopatógenos *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, bem como a ação sobre o micro-organismo *Bacteroides fragilis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção das amostras vegetais

O cultivo das plantas foi feito nos meses de março a junho do ano 2010, no Horto de Plantas medicinais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, localizado no município de

Santo Antônio de Jesus, Latitude 12° 57' 59.2", Longitude 39° 15' 49.4" LO. Todo o tratamento de herborização seguiu o protocolo descrito por Mori *et al.* (1989). O material botânico coletado foi depositado no herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS) e identificado por especialista pelo sistema de classificação de Cronquist (1981) como *Ocimum americanum* L. (HUEFS 167947) e *Ocimum basilicum* L. (HUEFS 167950), ambos da família *Lamiaceae*.

2.2. Extração de óleo essencial

A técnica de hidrodestilação por arraste a vapor foi utilizada para obtenção dos óleos essenciais a partir de folhas e flores secas das plantas. A composição química do óleo essencial foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), em cromatógrafo Shimadzu CG-2010 acoplado a Espectrômetro de Massas CG/MS-OP 2010 Shimadzu. Os componentes foram identificados através da comparação dos espectros de massas obtidos com os da biblioteca do equipamento e por comparação dos Índices de Kovats (IK) calculados com a literatura (Adams, 1995) empregando uma série homóloga de hidrocarbonetos.

2.3. Determinação da atividade antimicrobiana sobre bactérias anaeróbias estritas

Os testes de suscetibilidade microbiana aos óleos essenciais foram realizados segundo o método de macrodiluição em caldo do CLSI M11-A5, com modificações. Cepas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43717), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) e o micro-organismo controle *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), preservadas em Skim-milk (10%) a -80°C todas doadas pelo laboratório de anaeróbios da Universidade de São Paulo foram ativadas em ágar sangue com 5% de sangue de carneiro desfibrinado, suplementado com hemina (5 µg.mL⁻¹) e menadiona (vitamina K, 1 µg.mL⁻¹) e incubadas em anaerobiose (90% N₂ e 10% CO₂) a 37°C por 72 horas para serem utilizadas na realização dos testes de suscetibilidade. O inóculo bacteriano teste foi preparado suspendendo colônias da cultura recente em 5 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) suplementado com hemina (5 µg.mL⁻¹) e menadiona (vitamina K, 1 µg.mL⁻¹), seguido de incubação em anaerobiose (90% N₂ e 10% CO₂) a 37°C durante 48 horas. Após o período de incubação, o inóculo bacteriano foi ajustado pelo método visual a escala 0.5 de McFarland (1,5 x 10⁸ UFC.mL⁻¹). Soluções estoques (de óleos essenciais) esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 µm, com concentração de 50 mg.mL⁻¹ foram preparadas utilizando como solvente Tween 80 10%. Para os testes foram usadas concentrações crescentes dos compostos na ordem

de 0,00625 a 3,2 mg.mL⁻¹. A cada tubo de ensaio preparado foram adicionados 40 µL do inóculo bacteriano ajustado na turvação correspondente à escala 0.5 de McFarland. O material foi incubado em anaerobiose (90% N₂ e 10% CO₂) a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação (48 horas) foi feita a leitura pelo método visual, observando a turvação do meio e/ou a presença de sedimento no fundo do tubo de ensaio como indicativo de crescimento microbiano e ausência de atividade antimicrobiana. Como controle foram utilizados gluconato de clorexidina 0,12% (Periogard Colgate®), controle de viabilidade dos micro-organismos, esterilidade do meio e influência do solvente (Tween) sobre o crescimento microbiano. Toda a metodologia foi feita em triplicata. Para aqueles tubos de ensaio com ausência visível de crescimento na etapa de determinação da CIM, 10 µL foram semeados em ágar sangue suplementado com hemina (5 µg.mL⁻¹) e menadiona (vitamina K, 1 µg.mL⁻¹) e incubados em anaerobiose (90% N₂ e 10% CO₂) a 37°C por 72 horas para determinação da CBM.

3. RESULTADOS

3.1. Atividade antimicrobiana

A tabela 1 mostra os resultados da atividade antimicrobiana frente aos periodontopatógenos e micro-organismo anaeróbio estrito, *Bacteroides fragilis*.

Os óleos essenciais extraídos de folhas e flores, tanto de *O. americanum* quanto de *O. basilicum* mostraram destacada ação contra *P. gingivalis* (CIM 0,0125 mg.mL⁻¹ e 0,00625 mg.mL⁻¹, para óleo essencial extraído de folha e flores de *O. americanum*, respectivamente; e CIM 0,00625 mg.mL⁻¹ e 0,0125 mg.mL⁻¹ para óleo de folha e flores de *O. basilicum*, respectivamente).

O segundo periodontopatógeno considerado mais sensível foi o *Fusobacterium nucleatum*. Foram registrados valores de CIM de 0,4 mg.mL⁻¹ para óleo essencial extraído de folha e flores de *O. americanum*, CIM de 3,2 mg.mL⁻¹ para o óleo essencial extraído de folhas de *O. basilicum* e valores de CIM maiores que 3,2 mg.mL⁻¹ para o óleo essencial extraído de flores de *O. basilicum*.

Valores de CIM maiores que 3,2 mg.mL⁻¹ para todos os compostos testados foram registrados para o micro-organismo *A. actinomycetemcomitans*, considerado neste estudo o periodontopatógeno mais resistente.

O micro-organismo controle *Bacteroides fragilis* foi mais sensível a ação do óleo essencial extraído de flores de *O. basilicum* (CIM 0,2 mg.mL⁻¹) e os resultados da CIM registrados para clorexidina a 0,12% variaram de 0,001875 a 0,0075 mg.mL⁻¹.

TABELA 1. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DADAS EM mg.mL⁻¹ DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATO METANÓLICO DE *Ocimum americanum* E *Ocimum basilicum* FRENTE A MICRO-ORGANISMOS.

COMPOSTOS	MICRO-ORGANISMOS							
	<i>B.fragilis</i>		<i>A.a.*</i>		<i>P.gingivalis</i>		<i>F.nucleatum</i>	
ÓLEO ESSENCIAL	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>O. americanum</i> (folhas)	0,8	0,8	>3,2	>3,2	0,0125	0,0125	0,4	0,4
<i>O. americanum</i> (flores)	0,4	0,4	>3,2	>3,2	0,00625	0,00625	0,4	0,4
<i>O. basilicum</i> (folhas)	0,4	0,4	>3,2	>3,2	0,00625	0,00625	3,2	3,2
<i>O. basilicum</i> (flores)	0,2	0,2	>3,2	>3,2	0,0125	0,0125	>3,2	>3,2
CONTROLE								
Clorexidina 0,12%	0,0075	0,0075	0,0075	0,0075	0,001875	0,001875	0,00375	0,00375
Tween 10%	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E	S.E

* *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, S.E – Sem Efeito

TABELA 2. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DA PLANTA *Ocimum americanum*

Composto	IK _{lit}	IK _{calc}	Folhas %	Flores %
α-Pineno	939	939	1,0	0,7
Sabineno	975	977	0,5	0,3
β-pineno	979	982	1,1	0,7
Mirceno	990	992	0,6	0,3
Limoneno	1029	1033	1,2	0,6
1,8-Cineol	1031	1036	10,4	6,7
E-β-Ocimeno	1050	1051	1,6	1,3
Fenchona	1092	1086	1,2	0,5
Linalol	1096	1100	3,0	5,6
Cânfora	1146	1150	2,1	2,0
Terpinen-4-ol	1177	1182	2,3	1,8
Metil chavicol	1196	1200	9,7	6,8
Z-Cinamato de metila	1299	1305	6,5	4,6
E-Cinamato de metila	1378	1388	45,5	54,4
E-Cariofileno	1419	1427	0,9	1,1
Germacreno D	1485	1489	1,0	1,1
Total			88,6	88,5
Não identificados			11,4	11,5

IK_{lit} - Índice de Kovats na literatura. IK_{calc} - Índice de Kovats calculado

Conforme valores registrados para Concentração Bactericida mínima (CBM), todos os compostos testados apresentaram atividade bactericida.

3.2. Perfil cromatográfico dos óleos essenciais

As tabelas 2 e 3 mostram a composição química do óleo essencial de *Ocimum americanum* e *Ocimum basilicum*.

Os resultados apontaram como princípio ativo majoritário do óleo essencial de *O. americanum* o E-metil cinamato, perfazendo 45,5% do óleo essencial extraído de folhas e 54,4% do óleo extraído de flores de *O. americanum* (Tabela 2).

O óleo essencial de folhas de *O. basilicum* apresentou 18% de metil eugenol, 12% de cariofileno, 11,2% de 1,8-cineol e o óleo de flores 15,9% de linalol, 13,4% de 1,8-cineol e 12,5% de cariofileno (Tabela 3).

4. DISCUSSÃO

O crescente aumento de resistência bacteriana a antibioticoterapia vem sendo interesse de pesquisas recentes. Carter *et al.* (2016) concluíram que dos 215 entrevistados, 92% consideraram que o uso inapropriado de antimicrobianos contribui para o aumento do número de cepas bacterianas resistentes, porém 70% não consideram a resistência bacteriana um problema de saúde pública. Tal fato mostra a necessidade de maior conscientização da população sobre o tema, bem como desperta o interesse no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas no combate a micro-

TABELA 3. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DA PLANTA *Ocimum basilicum*

Composto	IK _{lit}	IK _{calc}	Flores %	Folhas %
α-Pineno	939	939	0,9	0,5
Sabineno	975	977	0,5	0,4
β-pineno	979	982	1,8	1,3
Mirceno	990	992	0,6	0,5
Limoneno	1029	1033	0,4	0,5
1,8-Cineol	1031	1036	13,4	11,2
Z-β-Ocimeno	1037	1044	3,1	5,1
Linalol	1096	1100	15,9	2,2
Eugenol	1359	1359	2,9	9,3
β-Elemeno	1390	1396	6,4	2,7
Metileugenol	1403	1403	2,1	18,0
Cariofileno	1419	1427	12,5	12,0
α-Humuleno	1454	1461	3,5	2,6
β-Selineno	1490	1492	1,7	2,2
Biciclogermacreno	1500	1502	14,6	4,7
α-Bulneseno	1500	1502	2,8	4,1
Elimicina	1557	1558	2,1	14,6
Espatuleno	1578	1584	1,8	1,8
Total			87,0	93,7
Não identificados			13,0	6,3

IK_{lit} - Índice de Kovats na literatura. IK_{calc} - Índice de Kovats calculado

organismos.

Neste cenário, as plantas medicinais assumem um papel importante, pois são fontes de moléculas ativas com potencial antimicrobiano. Por isso, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial das espécies *Ocimum americanum* e *Ocimum basilicum* no controle de crescimento de periodontopatógenos.

Diversas propriedades biológicas têm sido comprovadas para as espécies do gênero *Ocimum*, como as atividades hipoglicemiante, anti-inflamatória, antinociceptiva, antileishmania, tripanossomicida (Rabelo *et al.*, 2003; Ueda-Nakamura *et al.*, 2006), atividade antibacteriana e antifúngica (Suppakul *et al.*, 2003).

Embora ainda não exista um consenso sobre qual seria a concentração inibitória mínima ideal para produtos naturais, quando comparados a antibióticos padrões, segundo Holetz *et al.* (2002), a atividade de um composto extraído de plantas medicinais deve ser considerada ótima quando a CIM é menor

que 1,0 mg.mL⁻¹.

Levando esta classificação em consideração, podemos sugerir que os óleos essenciais estudados apresentaram resultados relevantes para o controle do crescimento dos periodontopatógenos *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e micro-organismo controle *B. fragilis*. A escolha da bactéria *B. fragilis* como micro-organismo controle se deve a alta resistência a agentes antimicrobianos, tradicionalmente usados no tratamento de infecções causadas por anaeróbios, apresentada por este patógeno (Nakano *et al.*, 2011).

Foram observados valores menores de concentração inibitória mínima para bactéria *P. gingivalis*, considerada a mais sensível à ação do óleo essencial de *O. americanum*. Da mesma forma, Thaweboon *et al.* (2012) utilizando a técnica ágar difusão para determinar a CIM, mostraram que *P. gingivalis* foi sensível a ação do óleo desta planta; os autores registraram CIM igual 0,35 mg.mL⁻¹ para este patógeno (Thaweboon *et al.*, 2012).

A diferença nos resultados da CIM descrita para os estudos de Thaweboon em comparação a este estudo poderia ser explicada pela diferente composição do óleo essencial da planta medicinal, visto que a composição química dos óleos essenciais sofre a influência de fatores ambientais como: variações climáticas, diversidade de ambientes ecogeográficos, fotoperiodismo (Rapposelli *et al.*, 2015). Cabe também ressaltar que, por se tratar de um composto hidrofóbico, o óleo essencial tem maior dificuldade de difusão em ágar, o que poderia influenciar na atividade antimicrobiana registrada por Thaweboon.

Deve-se ter em mente que os testes de atividade antimicrobiana, no presente estudo, foram feitos para bactérias de vida livre e não na presença de biofilme dental, o qual segundo Feres *et al.* (2002) tem a capacidade de proteger os micro-organismos da ação de antimicrobianos. Além disso, segundo Stacy *et al.* (2016) a presença de bactérias comensais no biofilme dental contribui para a expressão de fatores de virulência nos periodontopatógenos.

Segundo He *et al.* (2013), o uso de bochecho com um antisséptico contendo óleo essencial em sua composição, associado ao procedimento de raspagem e alisamento radicular, foi capaz de inibir significativamente os níveis de *F. nucleatum* e *P. gingivalis* no biofilme supra e subgingival, quando comparado ao grupo controle. Cabe salientar, que o procedimento de raspagem e alisamento radicular por si só é capaz de reduzir os níveis de periodontopatógenos no biofilme dental, porém a associação de um antisséptico cuja composição apresenta compostos extraídos de plantas medicinais pode ser um tratamento coadjuvante eficaz à terapia periodontal.

A este respeito Takarada *et al.* (2004) fizeram um estudo comparativo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de plantas medicinais sobre a microbiota oral. Segundo o estudo, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de óleos extraídos de *Malaleuca alternifolia*, *Eucalyptus radiata* foi de 0,06 a 0,5% contra *A. actinomycetemcomitans* Y4, ATCC 29523, ATCC 29524 e *P. gingivalis* ATCC 33277, ATCC 53977, Su63 e W50 e *F. nucleatum* ATCC 25586. A exposição por 30 segundos das cepas de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* submetidas a ação dos óleos de *Leptospermum scoparium*, *Malaleuca alternifolia*, *Eucalyptus radiata* na concentração de 0,2 a 0,5% mostrou atividade bactericida. Porém, o óleo da *Lavandula officinalis* não mostrou atividade contra nenhuma cepa testada (Takarada *et al.*, 2004).

As atividades antimicrobianas registradas no presente trabalho devem-se aos compostos ativos presentes nos óleos essenciais. Os resultados do presente estudo apontaram como princípio ativo majoritário do óleo essencial de *O. americanum*, o composto E-metil cinamato. De fato, a espécie *O. americanum* é rica em óleos essenciais que podem possuir como constituintes majoritários metil cinamato, eugenol e metil-chavicol, dependendo do local de colheita (Vieira & Simom, 2000). Já em relação ao óleo essencial extraído de *O. basilicum* foi identificado como compostos majoritários: metil eugenol, cariofileno, 1,8-cineol, linalol. Segundo Pandey *et al.* (2014), os principais constituintes isolados da espécie *O. basilicum* foram linalol, metil chavicol, eugenol, metil cinamato, 1,8-cineol, bergamoteno, limoneno, geraniol.

Não foram encontrados na literatura trabalhos sobre a atividade do metil cinamato sobre periodontopatógenos, porém segundo Yousoff *et al.* (2011), o óleo essencial de espécies da família Zingiberaceae, rico em metil cinamato mostrou atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

A atividade do óleo de *O. basilicum* poderia ser explicada pela presença de linalol na composição química do óleo, pois segundo Alviano *et al.* (2005), o linalol presente no óleo de *Croton cajucara* foi capaz de inibir o crescimento de *P. gingivalis* em pacientes portadores de aparelho ortodôntico, o que constitui uma importante atividade, visto que o aparelho ortodôntico funciona como um meio propício para o acúmulo de biofilme dental.

O efeito antibacteriano do linalol também foi mostrado por Park *et al.* (2012) frente a cepa ATCC 33277 de *P. gingivalis* (CIM 0,8 mg.mL⁻¹), ATCC25586 de *F. nucleatum* (CIM 0,2 mg.mL⁻¹), ATCC43717 de *A. actinomycetemcomitans* (CIM 0,1 mg.mL⁻¹).

Neste trabalho, o óleo essencial extraído de flores de

O. basilicum apresentou 15,9% de linalol e CIM de 0,0125 mg.mL⁻¹ para *P. gingivalis* (ATCC 33277), CIM maior que 3,2 mg.mL⁻¹ para *F. nucleatum* (ATCC 25586) e CIM maior que 3,2 mg.mL⁻¹ para *A. actinomycetemcomitans* (ATCC 43717). Comparando os resultados de Park *et al.* (2012) com os achados do presente estudo, percebe-se que o efeito antimicrobiano do linalol isoladamente parece ser alterado quando o mesmo está presente no óleo essencial, possivelmente por interações com outros princípios ativos presentes no óleo.

Diante disso, as atividades antimicrobianas descritas, abrem um caminho para novas pesquisas sobre o estudo dos compostos ativos presentes nos óleos essenciais de plantas medicinais, com o objetivo de formular um fitoterápico capaz de controlar o crescimento do biofilme dental para tratamento da doença periodontal.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que os óleos essenciais estudados foram capazes de inibir o crescimento dos periodontopatógenos estudados, sendo os maiores valores de CIM registrados para o micro-organismo *A. actinomycetemcomitans* e os menores valores registrados para *P. gingivalis*. Estudos *in vivo* e sobre a formação do biofilme dental são necessários para comprovar as atividades descritas nesta pesquisa.

ABSTRACT

In Periodontal disease, the immune response to microbial challenge results in osteoclast activation and alveolar bone resorption, leading to tooth loss, so the search for chemical compounds with antimicrobial activity is relevant to control biofilm formation. With the increasing of bacterial resistance to antibiotics, the discovery of new drugs would be a useful tool, and in this scenario the medicinal plants are promising alternatives. In this study, the antimicrobial activity of essential oils extracted from leaves and flowers of *Ocimum americanum* and *Ocimum basilicum* was evaluated against the periodontopathogens *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43717), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) and against the bacteria *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285). The macrodilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). There were recorded lower values of MIC (0.00625 mg.mL⁻¹ to 0.0125 mg.mL⁻¹) against *P. gingivalis*, and the highest values (<3.2 mg.mL⁻¹) were recorded for *A. actinomycetemcomitans*. These

concentrations were considered bactericidal when MBC was assessed. The chemical composition of the oils showed the presence of linalool and methyl cinnamate, compounds with proven antimicrobial activity, which could explain the results. This project showed that medicinal plants studied were able to inhibit microbial growth, especially against *P. gingivalis*, presenting therefore biotechnological potential for use in dentistry.

UNITERMS: essential oil, Ocimum, antimicrobial activity, periodontopathogens

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio a pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Lindhe J. Pathogenesis of periodontitis. In: ___Clinical Periodontology and Implant Dentistry. 3. ed. Copenhagen: Munksgaard, 1999. p. 189-225.
- 2- Shoji M, Sato K, Yukitake H, Kondo Y, Narita Y. et al. Por Secretion System Dependent Secretion and Glycosylation of Porphyromonas gingivalis Hemin-Binding Protein 35. PLoS ONE 2011; 6(6):21372. doi:10.1371/journal.pone.0021372.
- 3- Wu T, Trevisan M, Genco RJ, Dorn JP, Falkner KL, Sempos CT. Periodontal disease and risk of cerebrovascular disease: the first National Health and Nutrition Examination Survey and its follow-up study. Arch Intern Med 2000; 160(18):2749-2755.
- 4- Macedo FR, Saba-Chujfi E, Pereira SAS, Costa EL, Melo Neto JP. Associação entre periodontite e doença pulmonar. RGO 2010; 58(1):47-53.
- 5- Ercan E, Eratalay K, Deren O, Gur D, Ozyuncu O, Altun B et al. Evaluation of periodontal pathogens in amniotic fluid and the role of periodontal disease in pre-term birth and low birth weight. Acta Odontol Scand 2013; 71(3):553, 559.
- 6- Plaza K, Kalinska M, Bochenska O, Meyer-Hoffert U, Wu Z, Fischer J et al. Gingipains of *Porphyromonas gingivalis* affect the stability and function of Serine Protease Inhibitor of Kazal-type 6 (SPINK6), a tissue inhibitor of human kallikreins. J Biol Chem. 2016 Jun 27. pii: jbc.M116.722942.
- 7- Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. Periodontology 2000, 1997; 14:12-32.
- 8- Cardoso Jorge, A. O. Natureza da Microbiota bucal. In: ___Microbiologia bucal. 3 ed. São Paulo: Editora Santos, cap.2, p. 33, 2007.
- 9- Dolgilevich S, Rafferty B, Kozarov L, Kozarov E. Genomic comparison of invasive and rare non-invasive strains reveals *Porphyromonas gingivalis* genetic polymorphisms. J Oral Microbiol 2011; 3: 5764.
- 10- Skottrup et al. Diagnostic evaluation of a nanobody with picomolar affinity toward the protease RgpB from *Porphyromonas gingivalis*, Anal. Biochem 2011, doi:10.1016/j.ab.2011.04.015.
- 11- O'Brien-Simpson NM, Veith PD, Dashper SG, Reynolds EC. Antigen of bacteria associated with periodontitis. Periodontol 2000, 2004; 35: 101-134.
- 12- Guerra L, Cortes-Bratti X, Guidi R, Frisan T 2011. The biology of the cytolethal distending toxins. Toxins 3:172-190
- 13- Zijngje V, Kieselbach T, Oscarsson J. Proteomics of Protein Secretion by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. PLoS ONE 2012; 7(7):e41662. doi:10.1371/journal.pone.041662, 2012.
- 14- Kajiya M, Komatsuzawa H, Papantonakis A, Seki M, Makihira S, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Omp29 is associated with bacterial entry to gingival epithelial cells by F-actin rearrangement. PLoS ONE 2011; 6(4):2011.
- 15- Maeda T, Maeda H, Yamabe K, Mineshiba J, Tanimoto I. et al. Highly expressed genes in a rough-colony-forming phenotype of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: implication of a mip-like gene for the invasion of host tissue. FEMS Immunol Med Microbiol 2009; 58:226-236.
- 16- Hung MC, Salim O, Williams JN, Heckels JE, Christodoulides, M. The *Neisseria meningitidis* macrophage infectivity potentiator protein induces cross-strain serum bactericidal activity and is a potential serogroup B vaccine candidate. Infect Immun 2001; 79:3784-3791.
- 17- Merrit J, Niu G, Toshinori O, Felicia Q. Autoaggregation Response of *Fusobacterium nucleatum*. Appl. Environ. Microbiol 2009; 75(24):7725-7733.
- 18- Ahn SH, Song JE, Kim S, Cho SH, Lim YK, Kook JK, Kook MS, Lee TH. NOX1/2 activation in human gingival fibroblasts by *Fusobacterium nucleatum* facilitates attachment of *Porphyromonas gingivalis*. Arch Microbiol. 2016;198(6):573-83.
- 19- Jewett A, Hume WR, Le H, Huynh TN, Han YW, Cheng G, Shi W. Induction of apoptotic cell death in peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells by an oral bacterium, *Fusobacterium nucleatum*. Infect Immun 2000; 68(4):1893-1898.
- 20- Kaplan JB. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications and potential therapeutic uses. J Dent Res 2010; 89: 205-218.
- 21- Karpathy SE, Qin X, Gioia J, Liu Y, Petrosino JF, Yerrapragada S, et al. Genome sequence of *Fusobacterium nucleatum* subspecies Polymorphum – a genetically tractable *Fusobacterium*. PLoS ONE 2007; 2(8): 659.
- 22- Mendes RT, Nguyen D, Stephens D, Pamuk F, Fernandes D, Van Dyke

- TE, Kantarci A. Endothelial Cell Response to *Fusobacterium nucleatum*. Infect Immun. 2016;84(7):2141-2148. doi: 10.1128/IAI.01305-15. Print 2016 Jul.
- 23- Ardila CM, López, MA., Guzmán IC. High resistance against clindamycin, metronidazole and amoxicillin in *Porphyromonas gingivalis* and Aggregati bacteractinomy cetem comitans isolates of periodontal disease. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2010; 15(6):947-951.
- 24- Japoni A, Vazin A, Noushadi S, Kiany F, Japoni S, Alborzi A. Antibacterial susceptibility patterns of *Porphyromonas gingivalis* isolated from chronic periodontitis patients. Med Oral Patol Cir Bucal 2011; 16(7):1031-1035.
- 25- Mandel ID. Antimicrobial mouthrinses: overview and update. J Am Dent Ass 1994; 125:2-10.
- 26- Mori SA. et al. Manual de manejo do herbário fanerogâmico. Ilhéus: CEPEC/CEPLAC, 1989.
- 27- Cronquist A. An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press, 1981.
- 28- Adams RP. Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Illinois: Allured Publishing Corporation, 1995.
- 29- Carter RR, Sun J, Jump RL. A Survey and Analysis of the American Public's Perceptions and Knowledge About Antibiotic Resistance. Open Forum Infect Dis. 2016; 30:112. doi: 10.1093/ofid/ofw112. eCollection 2016.
- 30- CLSI -Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard, 7th ed., M11-A5. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 31- Rabelo M, Souza EP, Soares PMG, Miranda AV, Matos FJA, Criddle DN. Antinociceptive properties of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) in mice. Braz J Med Biol Res 2003; 36:521-524.
- 32- Ueda-Nakamura T, Mendonca Filho RR, Morgado-Diaz JA, et al. Uighur traditional medicine syndrome of Abnormal Savda in men is associated with oxidative stress, which can be improved by Munziq and Mushil of Abnormal Savda. Therapie 2004; 59:483-484.
- 33- Suppakul P, Miltz J, Sonneveld K, Bigger SW. Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. J. Agric. Food Chem 2003;51:3197-3207.
- 34- Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR. et al. Screening of plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2002; 97(7):1027-1031.
- 35- Nakano V, Silva AN, Merino VRC, Wexler HM, Avila-Campos MJ. Antimicrobial resistance and prevalence of resistance genes in intestinal Bacteroidales strains. CLINICS 2011; 66(4):543-547.
- 36- Thaweboon S, Thaweboon B. *Ocimum americanum* L. essential oil exhibits antimicrobial activity against oral bacteria related to periodontal disease. Disponível em: URL: <http://www.apjtb.com/press/2012/B400.docx>
- 37- Rapposelli E, Melito S, Barmina GG, Foddai M, Azara E, Scarpa GM. Relationship Between Soil and Essential Oil Profiles in *Salvia desoleana* Populations: Preliminary Results 2015;10(9):1615-1618.
- 38- Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Goodson JM, Socransky SS. Antibiotic resistance of subgingival species during and after antibiotic therapy. J Clin Periodontol 2002; 29:724-735.
- 39- Stacy A, Fleming D, Lamont RJ, Rumbaugh KP, Whiteley M. A Commensal Bacterium Promotes Virulence of an Opportunistic Pathogen via Cross-Respiration MBio. 2016;7(3):28; pii: e00782-16. doi: 10.1128/mBio.00782-16.
- 40- He JY, Qi GG, Huang WJ, Sun XD, Tong Y, Peng CM, Zhou XP, Chen H. Short-term microbiological effects of scaling and root planing and essential-oil mouthwash in Chinese adults. J Zhejiang Univ Sci B 2013; 14(5):416 – 425.
- 41- Takarada KR, Kimizuka N, Takahashi K, Honma K, Okuda TK. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. Oral Microbiol Immunol 2004; 19:61-64.
- 42- Vieira RF, Simon JE. Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp.) found in the markets and used in traditional medicine in Brazil. Econ Bot 2000; 54(2):207-216.
- 43- Pandey AK, Singh P, Tripathi NN. Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: An Overview. Asian Pac. J. Trop. Biomed 2014; 4:682-694.
- 44- Yousoff MM, Ibrahim H, Hamid NA. Chemical characterization and antimicrobial activity of rhizome essential oils of very closely allied Zingiberaceae species endemic to Borneo: *Alpinia ligulata* K. Schum. and *Alpinia wuhenizii* Val Chem Biodivers 2011; 8(5):916-923.
- 45- Alviano WS, Mendonça-Filho RR, Alviano DS, Bizzo HR, Souto-Padrón T, Rodrigues ML, Bolognese AM, Alviano CS, Souza MM. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. Oral Microbiol Immunol 2005; 20(2):101-105.
- 46- Park SN, Lim YK, Feire MO, Cho E, Jin D, Kook JK. Antimicrobial effect of linalool and α -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. Anaerobe 2012. doi:10.1016/j.anaerobe.2012.04.001.

Endereço para correspondência:

Dr. Paulo José Lima Juiz

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Centro de Ciências da Saúde

Av. Carlos Amaral, 1015 – Cajueiro

CEP: 44570-000 – Santo Antônio de Jesus – Bahia – Brasil

E-mail: limajuiz@ufrb.edu.br