



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS VIII- PROFESSORA MARIA DA PENHA- ARARUNA  
CENTRO DE CIÊNCIAS, TECNOLOGIA E SAÚDE  
CURSO DE ODONTOLOGIA**

**VANÊSSA LACERDA GONÇALVES**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIADERENTE *in vitro* DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* LINN CONTRA *Enterococcus faecalis***

**ARARUNA/ PB  
2017**

**VANÊSSA LACERDA GONÇALVES**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIADERENTE *in vitro* DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* LINN CONTRA *Enterococcus faecalis***

Artigo apresentado à Coordenação do Curso de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba- Campus VIII, como requisito parcial para a obtenção do título de Cirurgiã-Dentista.  
Área de concentração: Odontologia.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Me. Naiana Braga da Silva.

**ARARUNA/PB  
2017**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do Trabalho de Conclusão de Curso.

G635a Gonçalves, Vanessa Lacerda.

Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do óleo essencial de *rosmarinus officinalis* linn contra *enterococcus faecalis* [manuscrito] / Vanessa Lacerda Gonçalves. - 2017

21 p.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências, Tecnologia e Saúde, 2017.

"Orientação : Profa. Ma. Naiana Braga da Silva, Coordenação do Curso de Odontologia - CCTS."

1. Plantas medicinais. 2. *Rosmarinus officinalis*. 3. *Enterococcus faecalis*.

21. ed. CDD 615.321

VANÊSSA LACERDA GONÇALVES

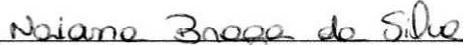
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIADERENTE *in vitro* DO ÓLEO ESSENCIAL  
DE *Rosmarinus officinalis* LINN CONTRA *Enterococcus faecalis*

Artigo apresentado à Coordenação do Curso  
de Odontologia da Universidade Estadual da  
Paraíba, como requisito parcial para a  
obtenção do título de Cirurgiã-Dentista.

Área de concentração: Odontologia.

Aprovada em: 03/10/2017.

BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Me. Naiana Braga da Silva (Orientador)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Me. Pedro Henrique Sette de Souza  
Universidade de Pernambuco (UPE)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Me. Renata de Oliveira Cartaxo  
Universidade de Pernambuco (UPE)

Dedico esse trabalho aos meus pais, Alirio Gonçalves Dias e Elinalva Lacerda Gonçalves, pelo amor incondicional, pelos valores transmitidos, por serem a base para concretização desse sonho.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por toda força e sabedoria e por ter iluminado meus passos durante essa caminhada.

Aos meus pais, Alirio Gonçalves Dias e Elinalva Lacerda Gonçalves, que acreditaram no meu potencial e acompanharam cada dia dessa trajetória com todo incentivo, empenho e compreensão.

Aos meus irmãos, Vinicius Lacerda Gonçalves e Maria Vitória Gomes Sarmiento de Souza, pela confiança, apoio, por cada momento de afeto e companheirismo, vocês me impulsionam a seguir em frente.

Aos meus avós, João Lacerda de Souza e Rita Maria de Souza (*in memoriam*), pelo exemplo de vida e pela contribuição na formação do meu caráter.

Aos familiares, pelo carinho e orações que me fortaleceram nessa conquista.

À minha orientadora, Naiana Braga da Silva, pelo exemplo de ser humano, pelos ensinamentos, por ter aceitado esse desafio, por toda dedicação no laboratório, nas orientações, pela paciência, atenção, motivação e pela amizade que ultrapassa o ambiente acadêmico.

Aos membros da banca, professor Pedro Henrique Sette de Souza, pela disponibilidade de tempo e do laboratório para a realização dessa pesquisa e pelo apoio prestado, e a professora Renata de Oliveira Cartaxo, por sua competência, carisma e dedicação na transmissão de conhecimentos, que foram essenciais para minha formação. Obrigada por terem aceitado o convite e pelas contribuições, que permitiram o aprimoramento desse trabalho.

Aos amigos, que fizeram essa caminhada se tornar mais leve, agradeço todo incentivo e carinho.

À minha amiga e companheira, Maria de Fátima Fernandes de Abrantes, pela ótima convivência durante esses 5 anos, pela cumplicidade na clínica, no dia a dia e pela amizade.

A meu amigo, Cicero Kennedy de Freitas, uma pessoa extraordinária, que tive o privilégio de conhecer na graduação e quero levar para o resto da vida. Obrigada pela presença nos momentos mais difíceis, pelas palavras de incentivo, pela ajuda e por todas as aventuras vivenciadas.

A todos, que torcem pelo meu sucesso pessoal e profissional.

“Entrega o teu caminho ao SENHOR, confia nele, e o mais ele fará.” Salmos 37:5

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela/Quadro</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>Tabela 1</b>	Determinação da CIM	15
<b>Tabela 2</b>	Determinação da CIMA	15
<b>Quadro 1</b>	Classificação de Inibição de Biofilme	14

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>SIGLA</b>	<b>DEFINIÇÃO</b>
<b>ATCC:</b>	American Type Culture Collection
<b>ANVISA:</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>BHI:</b>	Brain Heart Infusion
<b>CIM:</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CIMA:</b>	Concentração Inibitória Mínima de Aderência
<b>D6:</b>	Sexta diluição
<b><i>E. faecalis</i>:</b>	Enterococcus faecalis
<b>et al:</b>	Outros
<b>GC-MS:</b>	Cromatografia Gasosa com espectrômetro de massa
<b>HPLC:</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>LABDEM:</b>	Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos
<b>Nº:</b>	Número
<b>pH:</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>RDC:</b>	Resolução da Diretoria Colegiada
<b>sp.</b>	Espécie
<b>UFCs:</b>	Unidade Formadora de Colônias

## LISTA DE SÍMBOLOS

SÍMBOLO	SIGNIFICADO
$\alpha$ :	Alfa
cm:	Centímetro
°C:	Graus Celsius
$\mu\text{g}$ :	Micrograma
$\mu\text{l}$ :	Microlitro
mg:	Miligrama
mL:	Mililitro
mm:	Milímetro
nm:	Nanômetro
%:	Porcentagem

## SUMÁRIO

Página

**LISTA DE TABELAS E QUADROS**

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**LISTA DE SÍMBOLOS**

**RESUMO**

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>MEDOTOLOGIA</b> .....	12
2.1	DELINEAMENTO GERAL DO ESTUDO.....	13
2.2	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	13
2.3	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ADERÊNCIA.....	13
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	14
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	15
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	18
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	18

## ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIADERENTE *in vitro* DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* LINN CONTRA *Enterococcus faecalis*

Vanêssa Lacerda Gonçalves\*  
vanessalacerda-15@hotmail.com

### RESUMO

A capacidade de formação de biofilme nos canais radiculares pelo *Enterococcus faecalis*, bem como sua resistência antimicrobiana, estimulam o desenvolvimento de alternativas terapêuticas, como soluções irrigadoras, a partir de plantas medicinais, para o controle de infecções causadas por essa espécie. O presente estudo avalia a atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* Linn contra o *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), utilizando os testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA), através do método da microdiluição seriada. Para determinação da CIM, utilizou-se uma microplaca esterilizada de 96 poços em que foram depositadas 100 µL do meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion), mais 100 µL do óleo essencial de alecrim realizando a microdiluição, partindo da concentração de 1000 µg/mL até 7,81µg/mL, em seguida, foram adicionados 100 µL do inóculo ajustado, incubando as placas a 37 °C durante 24 horas. Para a leitura dos resultados, foram adicionados 50 µL de corante resazurina 0,01%. A CIMA do *Enterococcus faecalis* foi determinada empregando-se o meio de cultura citado acima, contendo sacarose a 5%. Foi realizada a microdiluição da solução testada e as placas foram incubadas por 48 horas a 37 °C. A solução de cristal violeta (4%) foi usada para corar o biofilme formado, finalizando com a leitura em espectrofotometria. Os testes foram realizados em triplicata. Os resultados mostraram CIM de 500 µg/mL e CIMA de 250 µg/mL. O óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* apresentou efeito antibacteriano e ação antiaderente contra o *Enterococcus faecalis*.

**Palavras-Chave:** Plantas medicinais. *Rosmarinus officinalis*. *Enterococcus faecalis*. Biofilme.

### 1 INTRODUÇÃO

Os biofilmes são comunidades bacterianas envolta em uma matriz hidratada de substâncias exopolímeras, proteínas, polissacarídeos e ácidos nucléicos (COSTERTON, 2001), que se desenvolvem em superfícies abióticas e bióticas, possuindo formação dinâmica e complexa. Na cavidade bucal são encontrados diversas espécies bacterianas, que necessitam de uma superfície sólida e um meio fluido provido de nutrientes para o desenvolvimento de biofilmes (COSTERTON et al, 1987).

---

\* Aluna de Graduação em Odontologia na Universidade Estadual da Paraíba – Campus VIII.  
Email: vanessalacerda-15@hotmail.com

O gênero *Enterococcus* sp. pertencente a família *Enterococcaceae*, são cocos fermentativos, não esporulados, facultativamente anaeróbios, Gram-positivos, organizados em pares ou cadeias, possuem coloração violeta na técnica de Gram, além de serem catalase-negativos (CRISPIM, LACERDA, 2014) e tolerarem condições extremas de temperatura e variações de pH (CRISPIM, FOGGIATTO, 2013). São encontrados comumente no trato gastrointestinal, cavidade oral, na vesícula biliar, embora com menos frequência no trato genital feminino e uretra masculina (WANG et al, 2012). São isolados em outros ambientes, como solo, água e vegetação aquática e terrestre (CRISPIM, FOGGIATTO, 2013).

Em odontologia, o *Enterococcus faecalis* é o patógeno bacteriano mais frequentemente isolado nos casos de infecções endodônticas primárias (LANA et al, 2001), persistentes (PINHEIRO et al, 2003). Localizam-se em áreas de difícil acesso como lacunas de reabsorção, cimentos, canais laterais e deltas, túbulos dentinários e lesões perirradiculares (SIQUEIRA et al, 1998). Esses locais favorecem a colonização pelo microrganismo por dificultar ou impedir a ação de soluções irrigadoras e instrumentos endodônticos, induzindo desta forma, infecções de difícil tratamento (KREFT, 1992).

A sobrevivência do *Enterococcus faecalis* nos canais radiculares está relacionada a alguns mecanismos de virulência, como aderência as células do hospedeiro, expressão de proteínas como resultado da alteração nutricional e ambiental, capacidade de competir com outras bactérias e alterar a resposta imune do hospedeiro (KAYAOGLU, ØRSTAVIK, 2004). Outros fatores de virulência são relatados na literatura, tais como substância de agregação, feromônios sexuais, ácido lipoteicoico, superóxido extracelular, gelatinase, hialuronidase e citolisina (LEE et al, 2004; KAYAOGLU, ØRSTAVIK, 2004; RÔÇAS, SIQUEIRA, SANTOS, 2004).

A utilização de substâncias químicas auxiliares no interior dos canais radiculares, desempenham papel fundamental no tratamento endodôntico, pois promovem a dissolução de tecidos orgânicos vivos ou necrosados, a lubrificação dos canais radiculares, contribuem para remoção do biofilme bacteriano encontrado em superfícies não instrumentadas, além de manterem os detritos oriundos da instrumentação em suspensão (NAVARRO-ESCOBAR, GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, FERRER-LUQUE, 2010).

As soluções irrigantes mais utilizadas no tratamento dos canais radiculares são o hipoclorito de sódio e a clorexidina. O hipoclorito de sódio é encontrado em diferentes concentrações que variam de 0,5 % a 6% (BERBER et al, 2006), apresenta excelente atividade antibacteriana (ZEHNDER, 2006), no entanto, esse agente químico em altas concentrações é tóxico aos tecidos vitais (JHAJHARIA et al, 2015). A clorexidina está

indicada em casos de alergia ao hipoclorito ou em dentes com polpa necrosada associado à risogênese incompleta (BORZINI et al, 2016). Comercialmente está disponível em solução aquosa ou em gel, nas concentrações que variam de 0,2% a 2% (ZEHNDER, 2006), possui efeito antibacteriano de amplo espectro, além de substantividade e biocompatibilidade, sendo menos tóxica quando comparado ao hipoclorito de sódio.

Nas últimas décadas, é crescente a busca por terapias alternativas menos agressivas, por meio do uso terapêutico de plantas naturais (YUNES, PEDROSA, FILHO, 2001). Várias plantas medicinais têm sido utilizadas em decorrência de suas propriedades antimicrobianas, resultante dos compostos sintetizados pelo metabolismo secundário das mesmas (JANSEN, CHEFFER, SVENDSEN, 1987).

*Rosmarinus officinalis* Linn, comumente conhecido como alecrim, pertence à família Lamiaceae, é nativo da região mediterrânea da Europa, e se desenvolve em vários países de clima temperado como Austrália, Itália, Grécia, Portugal, Brasil entre outros (CRISPIM, FOGGIATTO, 2013).

As propriedades biológicas do óleo essencial de alecrim estão diretamente relacionadas aos seus compostos fitoquímicos. A composição química e o teor dos constituintes presentes no óleo essencial de alecrim podem variar dependendo da região de cultivo, clima, solo, tempo, da origem do material da planta (fresco ou seco), colheita, da variação geográfica (latitudes e longitudes), e do método de extração (SEFIDKON et al, 2007).

O Brasil possui uma ampla biodiversidade como fonte sustentável para novos fármacos. Esse fato, atrelado ao interesse pelo uso de medicamentos fitoterápicos impulsiona a realização de estudos sobre as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais que podem promover o desenvolvimento de substâncias químicas auxiliares, importante para a odontologia, por constituírem uma alternativa terapêutica para o tratamento dos canais radiculares.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* Linn contra o *Enterococcus faecalis*.

## **2 METODOLOGIA**

Estudo com abordagem indutiva e procedimento estatístico-comparativo, com técnica de observação direta intensiva em laboratório (MARCONI, LAKATOS, 2011).

## 2.1 DELINEAMENTO GERAL DO ESTUDO

O óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* Linn foi obtido em farmácia de manipulação local, submetido à análise química e, posteriormente, preparado para avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) no Laboratório de Desenvolvimento e Ensaios de Medicamentos (LABDEM) da Universidade Estadual da Paraíba. A CIM encontrada foi utilizada como parâmetro para avaliação do efeito antiaderente.

## 2.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

O efeito antimicrobiano do óleo essencial foi avaliado sobre a cepa padrão de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Os inóculos foram preparados no dia anterior e ajustados no dia do experimento, por meio de espectrofotometria. A determinação da CIM ocorreu por meio da técnica de microdiluição seriada, acrescentando-se aos poços das placas 100µL de meio de BHI (Becton Dickinson GmbH - Heidelberg, Alemanha), mais 100 µL da diluição do insumo farmacêutico ativo vegetal em teste de forma seriada (partindo da concentração de 1000 µg/mL até 7,81 µg/mL) e finalizando com 100 µl do inóculo ajustado, com concentração final de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL, restando em cada poço 200 µL. Os ensaios foram conduzidos em triplicata e as placas incubadas a 37 °C durante 24 horas. Após esse período, 50 µL de corante resazurina 0,01% foram colocados nos poços das placas de microdiluição, que novamente foram incubadas por 2 horas a 37 °C. Foram realizados controles da viabilidade da cepa testada (meio apenas com inóculo), bem como controle positivo (meio com inóculo e clorexidina 0,12%).

## 2.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ADERÊNCIA

Para determinação do efeito antiaderente foi empregada a cepa padrão *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Foram utilizadas microplacas de 96 poços, as quais foram depositadas 100 µL do meio de cultura BHI (Becton Dickinson GmbH - Heidelberg, Alemanha) enriquecido com 5% de sacarose. A seguir, foram adicionadas aos poços das placas 100 µL da solução a ser testada, de forma seriada, utilizando concentrações partindo de 1000 µg/mL até 7,81 µg/mL, finalizando com 100 µL do inóculo ajustado, com concentração final de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Os ensaios foram conduzidos em triplicata e as placas incubadas a 37 °C durante 48

horas, com posterior lavagem dos poços e preparo para leitura em espectrofotometria, em leitor de placas (BIOCHROM EZ Read 2000 – Cambridge, Reino Unido).

Após transcorridas as 48 horas, o conteúdo dos poços foi esvaziado e as placas foram lavadas 3 vezes com solução tampão fosfato e colocadas para secar em estufa, a 37 °C, por 45 minutos. Secas, recebiam 110 µL de solução cristal violeta (4%), aguardando-se 45 minutos para corar o biofilme formado nos poços das placas. Decorrido o período de coloração, as placas foram lavadas 4 vezes com água destilada e recebiam 200 µL de álcool 95%, aguardando-se mais 45 minutos, finalizando-se com a transferência de 100 µL do conteúdo presente nos poços para uma nova placa de fundo chato, a qual foi levada para leitura em comprimento de onda de 525 nm. Foram realizados controle de crescimento (meio apenas com inóculo) e controle negativo (meio sem inóculo), além do controle positivo (meio com inóculo e clorexidina) e a porcentagem de inibição de biofilme foi calculada pela fórmula:

$$\% = \frac{\text{absorbância encontrada} - \text{absorbância do controle de crescimento}}{\text{absorbância do controle negativo} - \text{absorbância do controle de crescimento}} * 100$$

Após definidas as porcentagens, os grupos foram classificados quanto ao grau de inibição de biofilme como proposto por Peixoto et al (2017):

**QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO DE INIBIÇÃO DE BIOFILME**

ESCORE	VALOR DE REFERÊNCIA	CATEGORIA
0	≤ 25%	não inibição
1	>25% a ≥ 50%	fraca inibição
2	>50% a ≥75%	inibição moderada
3	>75% a ≥100%	forte inibição

FONTE: PEIXOTO et al (2017).

### 3 RESULTADOS

Os dados obtidos na avaliação antimicrobiana permitem definir o óleo essencial como antibacteriano, com CIM 500 µg/mL, como pode ser visto na tabela 1. Na avaliação antiaderente, como mostrado na Tabela 2, o óleo essencial em teste apresentou efeito inibidor da formação de biofilme, com CIMA de 250 µg/mL, apresentando forte inibição até a concentração de 500 µg/mL, a partir de 250 µg/mL o grau de inibição passa a classificação de moderado, atingindo fraca inibição nas concentrações menores.

TABELA 1- DETERMINAÇÃO DA CIM

Concentrações (µg/mL)	<i>E. faecalis</i>
1000	+
500	+
250	-
125	-
62,5	-
31,25	-
15,62	-
7,81	-

Fonte própria

TABELA 2- DETERMINAÇÃO DA CIMA

Conc. do OE	Valor de absorbância	%inibição
1000µg/ml	0,050	110,2
500µg/ml	0,175	78,2
250µg/mL	0,250	58,9
125µg/mL	0,450	7,6

Fonte própria

#### 4 DISCUSSÃO

Na microbiologia existem várias técnicas de difusão e diluição para avaliar a atividade antimicrobiana de produtos derivados das plantas medicinais. Alguns aspectos intervêm na sensibilidade destes métodos, a serem considerados, como meios de cultura, pH, taxa de oxigênio, inóculo, condições de incubação e meios aplicados para aperfeiçoamento da análise do diâmetro do halo no método de difusão em ágar (OSTROSKY et al, 2008).

Além disso, os óleos essenciais são produtos voláteis, insolúveis em água, viscosos, e que possuem uma vasta composição química, características que também influenciam diretamente nos valores obtidos pelos testes antimicrobianos *in vitro* (VERGIS et al, 2015).

O método da microdiluição foi utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana e o efeito antibiofilme através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA), respectivamente. É muito empregado em razão do seu baixo custo, sensibilidade, reprodutibilidade, utilização para muitos isolados, obtenção de resultados quantitativos, necessidade de pequena quantidade de amostra, o que proporciona várias réplicas e aumenta a confiabilidade dos resultados (OSTROSKY et al, 2008).

Luqman et al (2007) avaliou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* contra várias bactérias gram-positivas e gram-negativas resistentes a

drogas, utilizando o método de difusão de disco. Foi verificado que, a solução testada mostrou-se eficaz contra várias espécies bacterianas gram-positivas, exceto para o *Enterococcus faecalis*, o que está de acordo com o estudo de Martac, Podea (2012) que também observou fraca atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* contra o *E. faecalis* através do teste de difusão em disco.

Em estudo realizado por Filho et al (2015), foi empregado o método de difusão em disco para avaliar a ação antibacteriana da tintura hidroalcoólica de *Rosmarinus officinalis*, que foi adquirida no comércio, com diluição industrial de 20% em álcool 70%, adotada no estudo, como concentração pura e em decorrência do álcool estar contido na formulação comercial, foi realizada a diluição das tinturas de (1:1) forma pura até (1:64) (D6 – sexta diluição). A tintura apresentou ação antimicrobiana contra o *E. faecalis* com formação de halos de inibição em (1:1) de 9 mm de diâmetro, na concentração de 900 mg/mL e de 7 mm em (1:64), na concentração de 14,0625 mg/mL.

Diante do exposto, torna-se difícil a comparação entre os resultados citados com os encontrados nesse estudo, pois os testes de susceptibilidade antimicrobiana possuem variantes e isso resulta em alterações sobre os resultados encontrados, evidenciando a necessidade da instituição de diretrizes para padronização das metodologias existentes (OSTROSKY et al, 2008).

Diferenças na composição química e atividade antimicrobiana dos produtos naturais (extratos hidroalcoólicos, tinturas e óleos essenciais) são motivados por fatores ambientais e o manuseio da planta, além da forma de extração, armazenamento (NASCIMENTO et al, 2007), método de análise, parte da planta utilizada (folha ou planta inteira) e preparo da matéria prima (*in natura* ou seca) (DELLACASSA et al, 1999).

Nesse estudo, o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* mostrou atividade antimicrobiana *in vitro* contra o *Enterococcus faecalis*, porém é importante realizar a caracterização química deste composto natural, a fim de identificar os metabólitos secundários e determinar os compostos que podem estar relacionados à atividade antibacteriana, evidenciando assim, a necessidade de aprofundamento desta pesquisa.

Na literatura, são encontrados alguns estudos (MORENO et al, 2006; DALMARCO, 2012; BERNARDES et al, 2010; MARTAC, PODEA, 2012; DAFERERA, ZIOGAS, POLISSIOU, 2003; JORDÁN et al, 2012; BUBONJA-SONJE, GIACOMETTI, ABRAM, 2011), que associam a propriedade antimicrobiana, dos diferentes produtos derivados da espécie *Rosmarinus officinalis*, a vários isolados presentes em sua composição fitoquímica, identificados através de métodos cromatográficos. No entanto, o ácido carnósico e o carnosol

são os mais citados, como principais responsáveis pela atividade antimicrobiana (MORENO et al, 2006; BERNARDES et al, 2010; JORDÁN et al, 2012; BUBONJA-SONJE, GIACOMETTI, ABRAM, 2011).

Porém, é difícil associar a um ou mais compostos principais, a ação antimicrobiana de óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos, pois os mesmos possuem uma vasta composição química, na qual, existe a possibilidade dos componentes que se encontram em menores quantidades poderem contribuir de forma significativa para essa propriedade biológica, sugerindo assim, que o efeito antimicrobiano dos produtos derivados de plantas medicinais ocorra através do sinérgismo entre os compostos químicos (JIANG et al 2011).

O *Enterococcus faecalis* apresenta resistência elevada a antibióticos (NALLAPAREDDY et al, 2006), e representa o principal patógeno encontrado nos biofilmes endodônticos e nas patologias perirradiculares, resistentes ao tratamento endodôntico dos canais radiculares. Baseado nessas informações, a espécie foi escolhida para ser usada no presente estudo.

A atividade antiaderente dos produtos de origem natural é avaliada através da Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) que determina a menor concentração da solução capaz de inibir a aderência bacteriana. As variações relacionadas à CIMA podem ser atribuídas à escolha do substrato, meio de cultura, quantidade de sacarose e tempo empregado para adesão (BARBIERI et al, 2007). Além disso, existem diferentes formas de leitura, como a contagem em UFCs, a observação em microscopia eletrônica de varredura, avaliação em espectrofotometria e análise visual da formação de película de adesão (BARBIERI et al, 2007).

A ausência de publicação, utilizando o método da concentração inibitória mínima de aderência do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* Linn, sobre a espécie bacteriana *Enterococcus faecalis*, sugere que esse é um dos primeiros estudos com esta abordagem, impedindo maiores discussões sobre os achados obtidos nesse trabalho.

Os resultados encontrados nesse estudo são favoráveis para o desenvolvimento de novas soluções irrigadoras, a partir das substâncias ativas do vegetal *Rosmarinus officinalis* Linn. Entretanto, nossos achados não podem ser extrapolados para situações *in vivo*. Contudo, impulsionam a realização de outras pesquisas que simulem as condições encontradas na cavidade bucal, para comprovar sua eficácia e aplicação clínica.

## 5 CONCLUSÃO

O óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* Linn apresentou efeito antibacteriano e ação antiaderente contra o *Enterococcus faecalis*. Estudos complementares são necessários para o desenvolvimento de uma substância alternativa de origem natural que atue no combate as bactérias contidas nos canais radiculares.

### ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND ANTIADHERENT *in vitro* OF ESSENTIAL OIL *Rosmarinus officinalis* LINN AGAINST *Enterococcus faecalis*.

#### ABSTRACT

The capacity of biofilm formation in the root canals by *Enterococcus faecalis*, as well as its antimicrobial resistance, stimulate the development of therapeutic alternatives, as irrigating solutions, from medicinal plants, for the control of infections caused by this species. The present evaluate the antimicrobial activity and antiadherent *in vitro* of essential oil of *Rosmarinus officinalis* Linn against *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), using the tests on Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Inhibitory Concentration of Adherence (MICA), through of method of serial microdilution. For determination of MIC, was used a sterilized microplate in 96-well where they were deposited 100  $\mu$ L of medium of culture BHI (Brain Heart Infusion), more 100  $\mu$ l of essential oil of rosemary performing the microdilution, starting from the concentration of 1000  $\mu$ g/mL up until 7,81 $\mu$ g/mL, then, was added 100  $\mu$ L of inoculum adjusted, incubating the plates at 37 °C for 24 hours. For reading the results, were added 50  $\mu$ L of dye resazurin 0,01%. The MICA of *Enterococcus faecalis* was determined employing the medium of culture above mentioned, containing sucrose at 5%. Was performed the microdilution of tested solution and the plates were incubated for 48 hours at 37 °C. The crystal violet solution (4%) was used to blush the formed biofilm, finishing with the reading in spectrophotometry. The tests were performed in triplicate. The results showed MIC of 500  $\mu$ g/mL and CIMA of 250  $\mu$ g/mL. The essential oil of *Rosmarinus officinalis* Linn presented antibacterial effect and antiadherent action against *Enterococcus faecalis*.

**Keywords:** Medicinal plants. *Rosmarinus officinalis*. *Enterococcus faecalis*. Biofilm.

#### REFERÊNCIAS

BARBIERI, D.S.V. et al. Analysis of the *in vitro* adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.624- 631, 2007.

BERBER, V. B. et al. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. **International Endodontic Journal**, v.39, n.1, p.10-17, 2006.

BERNARDES, W. A. et al. Antimicrobial Activity of *Rosmarinus officinalis* against Oral Pathogens: Relevance of Carnosic Acid and Carnosol. **Chemistry & biodiversity**, v. 7, 2010.

BORZINI, L. et al. Root Canal Irrigation: Chemical Agents and Plant Extracts Against *Enterococcus faecalis*. **The Open Dentistry Journal**, v.10, p.692-703, 2016.

BUBONJA-SONJE, M.; GIACOMETTI, J.; ABRAM, M. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1821-1827, 2011.

COSTERTON, J.W. Patogênese da fibrose cística e papel dos biofilmes na infecção persistente. **Tendências Microbiology**, v.9, n.2, p.50-52, 2001.

CRISPIM, G. J. B.; FOGGIATTO, J. Análise do potencial de ação bacteriolítico de *Rosmarinus officinalis* frente a cepas Gram positivas e Gram negativas. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 17, n.5, p. 33-50, 2013.

CRISPIM, G.J.B.; LACERDA, M.C.R.N. Análise da Ação Bacteriolítica da *Melaleuca Alternifolia* nas Principais Bactérias de Interesse Médico. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 18, n. 2, p. 67-75, 2014.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, p. 39-44, 2003.

DALMARCO, J. B. **Estudo das propriedades químicas e biológicas de *Rosmarinus officinalis* L.** 2012. 129 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

DELLACASSA, E. et al. *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.

FILHO, J. C.C .F. et al. Ação antibacteriana de *Rosmarinus officinalis* L. e *Maytenus ilicifolia* Mart. sobre bactérias orais. **Revista da Faculdade de Odontologia UPF**, v.20, n.3, 2015.

JANSEN, A. M.; CHEFFER, J. J.; SVENDSEN, A. B. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of test methods. **Planta Medica**, v. 53, n. 5, p. 395-398, 1987.

JHAJHARIA, K. et al. Biofilm in endodontics: A review. **Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry**, v.5, n.1, p. 1-12, 2015.

JIANG, Y. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n.1, p. 63-68, 2011.

JORDÁN, M. J. et al. Relevance of Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid Concentrations in the in Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Rosmarinus officinalis* (L.) Methanolic Extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 38, p. 9603-9608, 2012.

KAYAOGU, G.; ØRSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v.15, n.5, p.308-320, 2004.

KREFT, B. et al. A substância de agregação de *Enterococcus faecalis* medeia adesão a células tubulares renais cultivadas. **Infection Immunity**, v.60, n.1, p.25-30, 1992.

LANA, M. A. et al. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. **Oral Microbiology and Immunology**, v.16, n.2, p.100–105, 2001.

LEE, W. et al. Sonicated extract of *Enterococcus faecalis* induces cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 4, p.209-212, 2004.

LUQMAN, S. et al. Potential of rosemary oil to be used in drug-resistant infections. **Alternative Therapies**, v.13, n. 5, 2007.

MARCONI, Marina de Andrade; LAKATOS, Eva Maria. **Metodologia científica: ciência e conhecimento científico, métodos científicos, teoria, hipóteses e variáveis, metodologia jurídica**. 6. ed. São Paulo: Atlas, 2011.

MARTAC, I. M.; PODEA, P. Determination of antimicrobial and antioxidant activities of essential oil isolated from *Rosmarinus Officinalis* L. **Carpathian Journal of Food Science and Technology**, v. 4, n. 2, p. 40-45, 2012.

MORENO, S. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. **Free Radical Research**, v. 40, n. 2, p. 223-231, 2006.

NALLAPAREDDY, S. R. et al. Singh. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. **The Journal of Clinical Investigation**, v.116, n.10, p. 2799-2807, 2006.

NASCIMENTO, P. F. C. et al. Antimicrobial activity of the essentials oils: a multifactor approach of the methods. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n. 1, p.108-113, 2007.

NAVARRO-ESCOBAR, E.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M. P.; FERRER-LUQUE, C. M. Cytotoxic effects of two acid solutions and 2.5% sodium hypochlorite used in endodontic therapy. **Medicina oral, patologia oral y cirugía bucal**, v.15, n.1, p.90-94, 2010.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 2, 2008.

PEIXOTO, L.R. et al. Antifungal activity , mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobillis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. **Archives of Oral Biology**, v.73, p.179-185, 2017.

PINHEIRO, E. T. et al. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **International Endodontic Journal**, v.36, n.1, p.1-11, 2003.

RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA, J. F. JR.; SANTOS, K. R. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 5, p. 315-320, 2004.

SEFIDKON, F. et al. The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. **Food Chemistry**, v.100, p.1054-1058, 2007.

SIQUEIRA, J. F. Jr. et al. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black pigmented Gram-negative anaerobes and facultative bacteria. **Journal of Endodontics**, v. 24, n. 6, p. 414-416, 1998.

VERGIS, J. et al. Essential oils as natural food antimicrobial agents: a review. **Critical Reviews Food Science and Nutrition**, v.55, n.10, p.1320-1323, 2015.

WANG, Q. Q. et al. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. **International Journal of Oral Science**, v.4, n.1, p.19-23, 2012.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; FILHO, V. C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v.24, n. 1, p.147-152, 2001.

ZEHNDER, M. Irrigas do canal radicular. **Journal of Endodontics**, v.32, n.5, p.389-398, 2006.