

## **AVALIAÇÃO DA EMBRIOTOXICIDADE DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA SIDOIDES* CONTRA *STREPTOCOCCUS MUTANS* UTILIZANDO *DANIO RERIO*, UM VERTEBRADO MODELO**

Íris Flávia de Sousa Gonçalves; Adailton Pascoal do Nascimento; Davi Felipe Farias.

Universidade Federal da Paraíba-UFPB  
nascimento.ap@outlook.com

**Resumo:** Introdução: O Óleo Essencial de *Lippia sidoides* (OELs) possui ação antibacteriana promissora contra *Streptococcus mutans* (Concentração Inibitória Mínima – CIM de 5 mg/mL), um microrganismo associado à formação da cárie. Apesar do uso potencial do OELs como agente preventivo da cárie, estudos sobre a sua toxicidade são necessários. Neste contexto, o peixe-zebra (*Danio rerio*) é um modelo bastante utilizado para investigação de embriotoxicidade de substâncias bioativas em vertebrados. Objetivos: avaliar a embriotoxicidade da CIM do OELs contra *S. mutans* em *D. rerio*. Metodologia: Vinte e quatro embriões de *D. rerio* foram individualmente alocados em microplaca de 24 poços, sendo 20 embriões expostos a 5 mg/mL do OELs e 4 à meio E3 (controle interno). Foram preparadas 2 microplacas controle, uma com o emulsificante DMSO e a outra com meio E3. A cada 24 h, por um período de 96 h, os embriões foram analisados em busca de sinais de letalidade. Resultados: o OELs causou 100% de mortalidade dos embriões, enquanto os controles causaram mortalidade inferior a 15%. As mortes concentraram-se nas primeiras 24 h, sendo verificada especialmente a coagulação dos embriões. Conclusão: a CIM do OELs contra *S. mutans* apresentou toxicidade aguda contra embriões de *D. rerio*. No entanto, a Concentração Letal média (CL<sub>50</sub>) e a avaliação dos efeitos sobre outros vertebrados precisam ser realizadas.

**Descritores:** Teratogênicos, Testes de Sensibilidade Microbiana, Plantas medicinais, Saúde bucal.

### **Introdução**

O consumo de plantas medicinais tem base na tradição familiar e tornou-se prática generalizada na medicina popular. Atualmente, muitos fatores têm contribuído para o aumento da utilização deste recurso, entre eles, o alto custo dos medicamentos industrializados, o difícil acesso da população à assistência médica, bem como a tendência, nos dias atuais, ao uso de produtos de origem natural (BRASILEIRO *et al.*, 2008).

É importante salientar que o Brasil possui uma das maiores diversidades vegetais do

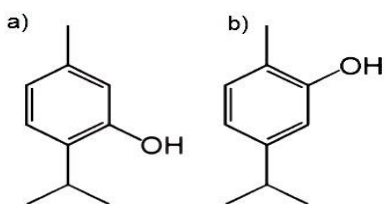
mundo e inúmeras experiências vinculadas ao conhecimento popular das plantas medicinais e tecnologia para correlacionar o saber popular e científico (COUTINHO *et al.*, 2004; ALBUQUERQUE & HANAZAKI, 2006).

Em estudo etnobotânico realizado por Santos *et al.* (2009), onde se identificou as principais plantas indicadas por raizeiros, para uso na saúde bucal, no município de João Pessoa, no estado da Paraíba, verificou-se uma diversidade considerável de plantas medicinais indicadas para tal uso. Sendo que

as plantas mais comercializadas são, na maioria dos casos, nativas da flora nordestina e do próprio estado.

Desse modo, a espécie *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae), uma planta nativa do Nordeste do Brasil, que tem sido rigorosamente estudada em busca de potenciais substâncias bioativas terapêuticas, produz um óleo essencial que possui ação antibacteriana e antifúngica promissora contra *Streptococcus mutans*, uma bactéria associada à formação da cárie (BOTELHO *et al*, 2007).

Experimentos diversos encontraram número importante de substâncias que constituem o Óleo Essencial de *L. sidoides* (OELs), entretanto, o timol e o carvacrol (Figura 1), monoterpênicos aromáticos, encontrados em diversas plantas aromáticas são seus principais componentes. Esses compostos possuem várias propriedades biológicas importantes, sendo comumente utilizados como anti-inflamatórios, antioxidantes, antibacterianos, antifúngicos, inseticidas, antioxidantes e anticarcinogênicos (BOTELHO *et al*, 2007; ALMEIDA, 2015; COSTA *et al*, 2002).



**Figura 1:** a) Timol; b) Carvacrol (2).

No que diz respeito à atividade bactericida e bacteriostática, estudos têm demonstrado que essa atividade está relacionada principalmente com a interação que esses compostos possuem com as membranas celulares dos diferentes microrganismos, onde provocam lesões. Isso ocorre devido às características físico-químicas destas moléculas, tendo em vista suas características lipofílicas, mas que ao mesmo tempo, também apresentam certa solubilidade em água, devido aos grupos hidroxila das moléculas. (ALMEIDA, 2015).

Em estudo realizado por Botelho *et al* (2007), onde foram analisadas as Concentrações Inibitórias Mínimas – CIM, menor concentração de substância bioativa, capaz de inibir o desenvolvimento de um microrganismo, do OELs contra diversos patógenos bucais, onde se inclui bactérias e fungos, a CIM encontrada para o *S. mutans* foi de 5 mg/mL.

Existe, portanto, a possibilidade do uso do OELs como agente preventivo da cárie, por se tratar de um produto derivado de plantas e, desse modo, ser de baixo custo em comparação com medicamentos alopáticos e outros meios preventivos (BOTELHO *et al*, 2007; BRASILEIRO *et al.*, 2008). Entretanto, antes de se indicar qualquer agente terapêutico para uso pela população, é

importante que se realizem estudos sobre a sua toxicidade em diferentes âmbitos.

Neste contexto, um momento de especial cuidado, com o uso de substâncias bioativas, é o de desenvolvimento embrionário. Isso porque qualquer agente permeável à placenta pode ser considerado perigoso pela possibilidade de desenvolvimento de alterações fetais e embrionárias de natureza morfológica e ou fisiológica (RAMOS *et al*, 2008).

Dentro deste cenário, o peixe-zebra (*Danio rerio*), um pequeno teleosteo (3 a 4 cm), que nos últimos anos vem atraindo a atenção da comunidade científica, é um modelo bastante utilizado para investigação de embriotoxicidade de substâncias bioativas em vertebrados (SILVEIRA *et al*, 2011).

Por conseguinte, tendo em vista a importância da avaliação de segurança de uso de plantas medicinais e a possível utilização do OELs como agente terapêutico associado à saúde bucal, esse trabalho teve como objetivo, avaliar a embriotoxicidade da CIM do OELs contra *S.mutans* utilizando o vertebrado modelo, *D. rerio*.

## Metodologia

Os testes foram realizados no Laboratório de Avaliação de Risco e Efeito de Novas Tecnologias - LabRISCO, do Departamento de Biologia Molecular da Universidade

Federal da Paraíba, campus 1, em João Pessoa, no estado da Paraíba, Brasil.

Foram utilizados embriões de *D. rerio*, de linhagem selvagem, reproduzidos, mantidos e estudados de acordo com as normas e recomendações da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB), cedidos gentilmente pelo Laboratório de Biotecnologia de Organismos Aquáticos (LaBOrA), que é coordenado pelo Prof. Dr. Ian Porto Gurgel Amaral, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Enquanto o OELs foi cedido pelo Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais da Universidade Federal do Ceará. A espécie estudada possui comprovante de registro para coleta no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) sob número 47978-1.

Os testes realizados seguiram os procedimentos recomendados pelo *Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*, nº 236, guia criado pela *Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)* que regulamenta os testes de avaliação de toxicidade aguda em embriões de peixe, sendo os resultados produzidos por esses testes aceitos mundialmente (OECD, 2013).

Seguindo os procedimentos do guia da OECD, quanto à reprodução dos peixes, captura, limpeza e desinfecção dos ovos.

Após o início do fotoperíodo claro, prosseguiu-se a escolha dos embriões recém-fertilizados, onde esses foram analisados quanto a sua viabilidade utilizando um estereomicroscópio, num aumento de 80X. Logo após, vinte e quatro embriões viáveis de *D. rerio* foram individualmente alocados em microplaca (p1) de 24 poços, onde 20 embriões foram expostos a 5 mg/mL do OELs e os outros 4 embriões expostos à meio E3 (preparado específico para a sobrevivência dos embriões) que serviram como controle interno (CI) da placa. Além disso, foram preparadas mais duas microplacas controle. Em uma das placas foi inserido o emulsificante DMSO (p2), a 4%, em meio E3, que foi utilizado como solvente do OELs, servindo como controle positivo. Outra placa foi preparada apenas com meio E3 em todos os poços (p3), sendo utilizada como controle negativo.

Após a preparação das placas, essas foram acondicionadas em ambiente adequado, de acordo com o *FET*, com temperatura ( $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e fotoperíodo (14h claro/10 h escuro) controlados.

A cada 24 h, por um período de 96 h, foi realizada análise dos embriões, utilizando um estereomicroscópio com aumento de 80X, visualizando suas estruturas em busca de sinais de letalidade. Os sinais buscados eram: desprendimento da cauda, que torna o

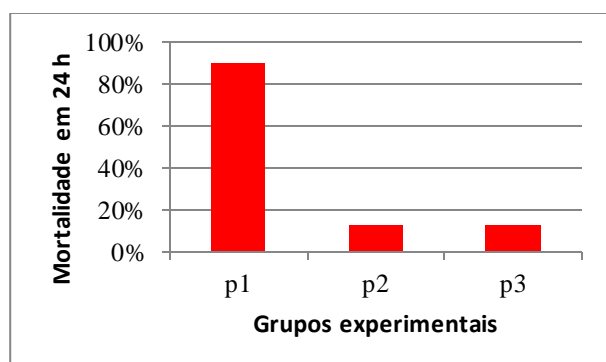
embrião inviável, pois mesmo que este se torne adulto, não será possível a movimentação, gerando assim impossibilidade de busca por alimentos e outras atividades vitais; ausência de formação de somitos, que indica que não haverá formação da coluna vertebral e músculos anexos da coluna no peixe; ausência de batimentos cardíacos, que indica má-formação e inatividade do mesmo; e coagulação, que se trata de uma destruição quase total do embrião, restando apenas massa amorfa. Portanto, a presença de quaisquer um desses sinais foi considerada como morte para fins de cálculos do percentual de mortalidade.

A organização e análise dos dados foram realizadas nos *softwares* Microsoft<sup>®</sup> Office Excel e Bioestat versão 5.3.

## Resultados e Discussão

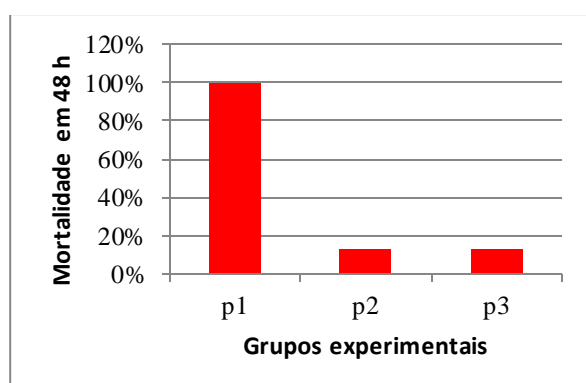
Como pode ser visto no Gráfico 1, após 24 h de imersão, a placa controle com meio E3 (p3), apresentou 03 embriões mortos dentre os 24 expostos, o que equivale a uma mortalidade de 12,5%. A placa com DMSO (p2), após o mesmo período de tempo, apresentou apenas um embrião coagulado (5% de mortalidade) nos poços onde os embriões estavam expostos a esse solvente, enquanto no controle interno, não ocorreram mortes. Entretanto, o que se verificou nos 20

poços de exposição dos embriões ao OELs (p1) foi uma quantidade de mortes considerável, onde 18 embriões (90%) já se apresentavam coagulados após 24 horas de exposição.



**Gráfico 1:** Percentual de mortes após 24 h de exposição dos embriões de *D. rerio* ao OELs (p1), DMSO e (p2) e meio E3 (p3).

Após 48 h, todos os embriões expostos ao OELs apresentavam-se coagulados. Enquanto que nas outras placas o resultado, até esse momento, não mudou (Gráfico 2).



**Gráfico 2:** Percentual de mortes após 48 h de exposição dos embriões de *D. rerio* ao OELs (p1), DMSO (p2) e meio E3 (p3).

Ao término das 96 h de exposição dos embriões de *D. rerio* ao OELs, os resultados permaneceram os mesmos mostrados no Gráfico 2.

A embriotoxicidade causada pelo OELs não fugiu do esperado, tendo em vista que, de acordo com Almeida (2015), os principais componentes do OELs podem atravessar e aumentar a permeabilidade de membranas celulares, assim podendo causar morte celular e morte do indivíduo como um todo, de acordo com a concentração.

Esse resultado evidenciou que, mesmo se tratando de um produto de origem natural e extraído de uma planta medicinal, o OELs apresentou toxicidade aguda em embriões de *D. rerio*, numa concentração que poderia ser potencialmente útil para o tratamento de infecções causadas por *S. mutans*. Esses dados não fogem ao que é visto na literatura, pois, segundo Rodrigues *et al* (2011), pôde-se observar em achados literários o fator embriotóxico, abortivo e teratogênico em algumas espécies de plantas medicinais. O mesmo estudo ainda verificou que para a maioria das plantas medicinais não há dados a respeito da segurança de seu uso.

Dado o exposto, fica evidente a necessidade de realização de testes de segurança de uso de produtos naturais antes de recomendá-los para uso pela população.

## Conclusões

De acordo com os resultados, a Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial de *Lippia sidoides* contra *Streptococcus mutans* apresentou toxicidade aguda contra embriões de *Danio rerio*. No entanto, mais testes devem ser realizados para se obter resultados mais consistentes. Além disso, a Concentração Letal média (CL<sub>50</sub>) e a avaliação dos efeitos tóxicos do OELs sobre outros vertebrados precisam ser realizados.

## Agradecimentos

Agradecemos ao Prof. Dr. Ian Porto Gurgel Amaral, do Laboratório de Biotecnologia de Organismos Aquáticos (LaBORA), do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), o qual cedeu gentilmente os organismos utilizados nos experimentos. Também somos gratos pela cessão da substância-teste por parte Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais da Universidade Federal do Ceará (UFC).

## Referências

- ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16 (Supl.): 678-689, 2006.
- ALMEIDA, R.R. Mecanismos de ação dos monoterpênos aromáticos: timol e carvacrol. Universidade Federal de São João del-Rei; Coordenadoria do Curso de Química, 2015.
- BOTELHO et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2007) 40: 349-356.
- BRASILEIRO, B. G.; PIZZIOLLO, V. R.; MATOS, D. S.; GERMANO, A. M.; JAMAL, C. M. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “Programa de Saúde da Família”, Governador Valadares, MG, Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas - Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 44, n. 4, out./dez., 2008.
- COSTA, S. M. O.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O.D. L.; ASSUNÇÃO, J. C. C.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2002.
- COUTINHO, H. D. M.; BEZERRA, D. A. C.; LÔBO, K; BARBOSA, I. J. F. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. *Conceitos*, 5: 77-85, 2004.
- OECD/OCDE. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. n.236, adotado em 26 de Julho de 2013.
- RAMOS, W. L. P.; BENEVENTO, C. E.; MALGARIN, J.; STEFANELLO, T. F.; RAMOS, E. R. de P. Análise do uso de medicamentos durante a gestação em mães de pacientes portadores de malformações fetais. *Revista Saúde e Pesquisa*, v. 1, n. 1, p. 59-64, jan./abr. 2008.
- RODRIGUES, H.G.; MEIRELES, C.G.; LIMA, J.T.S.; TOLEDO, G.P.; CARDOSO, J.L.; GOMES, S.L. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, v.13, n.3, p.359-366, 2011.
- SANTOS, E. B.; DANTAS, G. S.; SANTOS, H. B.; M. F. F. M. DINIZ; F. C. SAMPAIO. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia - Brazilian Journal of Pharmacognosy* - 19 (1B): 321-324, Jan./Mar. 2009.
- SILVEIRA, T. R. da; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. *Revista Pesquisa Fapesp*, 2011.