

Padronização da matéria-prima vegetal e determinação da atividade antimicrobiana do extrato bruto da *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae) frente ao *Streptococcus mutans*

Padronization of the plant material and antimicrobial activity evaluation of the crude extract from *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae) over *Streptococcus mutans*

Rogéria de Sousa Nunes¹; Ana Amélia Moreira Lira¹; Eulalia Ximenes²; José Aleksandro da Silva³ & Davi Pereira de Santana^{1*}

RESUMO – O objetivo deste estudo foi padronizar a matéria-prima e o extrato do vegetal *Lippia sidoides* Cham, bem como determinar sua atividade antimicrobiana frente ao *Streptococcus mutans*. Ensaios de perda por dessecação, teor de óleo essencial e perfil cromatográfico em CCD foram realizados para a matéria-prima, e para o extrato, após sua preparação, foram realizados os ensaios de resíduo seco, pH, teor de timol (CLAE) e atividade antimicrobiana. Sendo assim, pode-se afirmar que a matéria-prima e o extrato de *Lippia sidoides* Cham podem ser usados na produção de formulações de uso odontológico, pois a mesma foi padronizada e o extrato possui atividade antimicrobiana.

PALAVRAS-CHAVE – Padronização, Atividade Antimicrobiana, *Lippia sidoides* Cham.

SUMMARY – In this work we aimed the standardization of the plant material and crude extract of *Lippia sidoides* Cham as well as its antimicrobial activity evaluation over *Streptococcus mutans*. Dessiccation loss, essential oil content and TLC chromatographic assays were made with the plant material. For the crude extract, after its obtention, the dry residue, pH, timol content (HPLC) and antimicrobial activity assays were accomplished. In this way, it was possible to suggest that the plant material and the crude extract of *Lippia sidoides* Cham can be used to prepare products of odontologic uses due to the fact that both plant and crude extract were standardized and this last showed antimicrobial activity.

KEYWORDS – Standardization, antimicrobial activity, *Lippia sidoides* Cham.

INTRODUÇÃO

A *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae) é um arbusto do Nordeste do Brasil, encontrado principalmente nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte, popularmente conhecida como alecrim pimenta, que contém em sua composição um óleo essencial rico em Timol e Carvacrol, na qual apresenta propriedades bactericida, fungicida, moluscicida e larvicida (Cavalcanti *et al.*, 2004; Kunle *et al.*, 2003; Girão *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2003; Leal *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2002). Quando estes óleos são incorporados, na forma de tintura, em formulações do tipo Creme Dental ou Colutório, reduzem o crescimento de placa bacteriana em humanos (Girão *et al.*, 2003; Nunes, 1999; Fernandes-Filho *et al.*, 1998).

Numa indústria farmacêutica que produz medicamentos fitoterápicos, as drogas vegetais constituem o principal grupo de matéria prima, e é portanto a ela que se deve concentrar-se toda a atenção possível (Junior & Pinto, 2005), uma vez que a padronização farmacobotânica, verificação da pureza, qualidade química dos vegetais, associada a uma adequada técnica

de extração dos seus princípios ativos, são consideradas etapas imprescindíveis para a produção racional destes fitoterápicos (Baby *et al.*, 2005).

Os objetivos deste trabalho consistem na padronização da matéria prima e das condições de extração a partir do vegetal *Lippia sidoides* Cham, bem como a determinação da sua atividade antimicrobiana do extrato padronizado frente ao *Streptococcus mutans*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

A matéria-prima, folhas e inflorescência da *Lippia sidoides* Cham utilizada no preparo do extrato hidroalcoólico, foi cultivada e coletada no período de floração, em uma área experimental do Instituto de Pesquisas Agronômicas de Pernambuco (IPA) localizado no distrito de Itapirema, município de Goiana-PE. Uma exsiccata, desta espécie, encontra-se depositada no herbário da Universidade Federal de Pernambuco (Departamento de Botânica) e IPA sob o nº 52798 e que a mesma foi identificada e coletada pela taxonomista oficial do IPA Valdelice Correia Lima.

Recebido em 6/9/2005

¹Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético, Departamento Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Arthur de Sá, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50739-520, Recife, Brasil, e-mail: d-santana@bol.com.br. ²Instituto de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

³Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB, 58105-570, Brasil.

Microorganismo

Os microrganismos utilizados, neste estudo, foram quatro amostras de *Streptococcus mutans* isolados e identificados de pacientes portadores de placa bacteriana dental, examinados na clínica de odontopediatria do Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco. Estes microrganismos foram isolados no meio de cultura mitis salivarius e identificados pelo sistema Strep 20, Biomerieux.

Extrato e meios de cultura utilizados

Foi utilizado o extrato hidroalcoólico da *Lippia sidoides* Cham previamente padronizado, numa concentração equivalente a 820 µg de timol em cada disco. Os meios de cultura utilizados foram: mitis salivarius desidratado, usado para manutenção dos microrganismos e durante todo experimento; Caldo peptonado contendo 20% de sacarose, usado para preparação dos inóculos. Estes foram preparados conforme instruções dos fabricantes e esterilizado em autoclave à 121°C por 15 a 20 minutos.

Metodologia

Padronização da matéria-prima vegetal e das condições de extração

a) Determinação da perda por dessecação

A perda por dessecação foi determinada segundo metodologia adotada pela Farmacopéia Brasileira, IV edição, e que este parâmetro foi determinado ao longo de cinco meses de armazenamento, sendo os resultados expressos em percentagem (m/m).

b) Determinação do teor de óleo essencial

O teor de óleos essenciais da *Lippia sidoides* Cham foi determinado por arraste a vapor d'água, em aparelho de Clevenger modificado (Mesquita *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2005). Este teste foi realizado no tempo zero, e ao longo de cinco meses de armazenamento. Para análises dos resultados foi considerado o volume de óleo essencial em 100g de droga vegetal e em percentual do vegetal dessecado conforme descrição da Farmacopéia Brasileira, IV edição.

c) Análise qualitativa da *Lippia sidoides* Cham

Para a determinação da "impressão digital" da *Lippia sidoides* Cham, foi utilizado cromatografia em camada delgada, sendo utilizado uma solução padrão de timol à 1% (Merck). As amostras foram preparadas aquecendo, durante 10 minutos, 5g do material vegetal em 30mL de etanol, metanol e acetato de etila respectivamente.

Os cromatogramas foram obtidos empregando-se como fase estacionária placas cromatográficas de gel sílica e como fase móveis, misturas em proporções volumétricas dos seguintes sistemas: Sistema I – Benzeno: Acetato de etila (97:3) e vanilina sulfúrica para monoterpenóides como revelador. Sistema II – Acetato de etila: Ácido acético: Ácido fórmico: Água (100:11:11:26) e Difetilboriloxetilamina para fenóis como revelador segundo metodologia adotada por (Nunes, 1999).

d) Determinação da granulometria dos pós e obtenção do extrato hidroalcoólico da *Lippia sidoides* Cham

Para obtenção do extrato hidroalcoólico, na forma de tintura, as partes aéreas do vegetal *Lippia sidoides*

Cham (folhas e inflorescências) foram desidratadas em sala ventilada, temperatura ambiente e, posteriormente, trituradas em moinho manual. Após trituração, a técnica de granulometria por tamisação foi empregada, na qual foram utilizados tamises com aberturas de malhas de 2,5; 2,0; 1,6; 1,25; 0,8; 0,5; 0,25mm e coletor, esta operação de tamisação foi realizada durante 35 minutos à 90 vibrações por minutos (Prista *et al.*, 1995). Em seguida, foi realizada maceração em percolador de inox com capacidade de 20 Litros, durante 8 dias utilizando álcool etílico à 70%, na proporção de 20:100 droga/solvente. Após este procedimento, a percolação foi realizada com ajuste de gotejamento de 30 gotas por minuto.

e) Análise quantitativa do teor de timol

O teor de timol foi determinado a partir do método desenvolvido e validado por Nunes (1999), na qual foi utilizados um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) com sistema de injeção manual, equipado com Loop de 20µL, modelo HP série 1100 e integrador HP série 3395. Os extratos foram tratados em clorofórmio, obtendo 04 partições, onde uma alíquota foi diluída em metanol PA (Merck) e injetada no cromatógrafo.

f) Determinação do pH do extrato de *Lippia sidoides* Cham

O pH dos extratos, foi determinado em um pHmetro da série 3020 (Jenway) devidamente calibrado com uma solução tampão pH 7,0 e 4,0.

g) Determinação do resíduo seco (Rs) do extrato de *Lippia sidoides* Cham

O resíduo seco do extrato foi determinado pesando-se, exatamente 20g do extrato em pesa filtro (27 x 55mm), previamente tarado e deixando em estufa à 105°C por duas horas conforme descrição da Farmacopéia Brasileira, IV edição.

Determinação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Lippia sidoides* Cham

O método utilizado para a determinação da atividade antimicrobiana foi o de difusão em meio sólido preconizado por Bauer (1966) e estudado por Andrade *et al.* (2005). As preparações dos inóculos bacterianos foram realizadas diluindo as culturas de *Streptococcus mutans*, de maneira a obter uma turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mac Fairland, o que corresponde a 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Em placas de Petri estéreis de 90mm de diâmetro, foram distribuídos 18mL do meio Mitis Salivarius e deixado sobre uma superfície plana até completa solidificação. Os discos de papel de filtro, pesando 30mg ± 4mg/cm² e diâmetro de 6mm, foram preparados, impregnando-os com 20µL do extrato padronizado de *Lippia sidoides* Cham (Nunes, 1999).

As suspensões bacterianas padronizadas foram semeadas por esgotamento com Swabs estéreis em toda a superfície do meio. As placas de petri foram mantidas à temperatura ambiente para total absorção dos inóculos e incubadas à 37°C durante 18 horas. Após o período de incubação, as leituras foram efetuadas pela medida dos halos de inibição em torno do disco e comparadas com o padrão antibacteriano de Ciprofloxacina (1000µg/mL) e com o solvente contido no extrato, etanol à 70%, além de

se fazer, também, a determinação da concentração inibitória mínima (Acar & Gold Stain, 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Padronização da matéria-prima vegetal de *Lippia sidoides*

A caracterização de uma matéria-prima vegetal se dá dentro de um ciclo de processamento e, no caso dos fitoterápicos, pela correta qualificação da matéria-prima vegetal (Junior & Pinto, 2005). O ponto de partida para alcançar estes objetivos é através de um adequado protocolo de coleta, seguido da correta classificação Farmacobotânica para em seguida determinar outros parâmetros como, perda por dessecação, teor de óleo essencial, resíduo seco e perfil cromatográfico (Nunes *et al.*, 2000).

O estabelecimento do perfil cromatográfico em Cromatografia de Camada Delgada (CCD) foi utilizado como forma de caracterizar as folhas e inflorescências da *Lippia sidoides* Cham, pois este permite a montagem de uma "impressão digital" para a droga vegetal a partir de seus constituintes químicos. As CCD, tanto no sistema I como no Sistema II, demonstraram a identidade química da *Lippia sidoides* Cham, pois foi claramente evidenciado em função da coloração específica frente ao padrão timol. As análises das amostras mostraram um perfil cromatográfico com manchas que correspondiam a heterosídeos de flavona e heterosídeos de flavanonas.

O teste Farmacopéico, teor de óleo essencial, está descrito na Tabela I, na qual mostra o teor de óleo essencial tanto no vegetal fresco como no vegetal dessecado por 100g de amostra. Assim sendo, a presença dos constituintes voláteis existentes nas folhas e inflorescência da *Lippia sidoides* Cham foi confirmada. A presença, destes voláteis, nos vegetais está diretamente relacionada com a sua atividade biológica (Nunes, 1999).

A perda por dessecação (PD) apresentou um Coeficiente de Variação (CV%) de 0,2561m/m ao longo dos 5 meses de armazenamento. Segundo Prista *et al* (1995) a PD esta ligada a estabilidade microbiológica da planta, como expressão da sua susceptibilidade ao desenvolvimento de bactérias e fungos, e estabilidade química, representada especialmente pelos processos de hidrólise. Com isso, deduz-se que, as amostras de *Lippia sidoides* Cham não estavam contaminadas e que podiam ser utilizada, perfeitamente, para o estudo de determinação da atividade antimicrobiana, um dos objetivos deste estudo.

Padronização das condições de extração

A distribuição granulométrica influi na reprodutibilidade da extração, já que este fenômeno está relacionado com a superfície e espessura das partículas em contato com o líquido extrator (Prista *et al*, 1995). A Tabela II mostra o teor de timol em cada fração da análise granulométrica por tamisação. Observa-se que os teores de timol, em cada fração, estiveram bem próximos, isto pode ser explicado pela fragilidade das membranas dos tecidos da *Lippia sidoides* Cham, nos quais estão presentes nas glândulas que contém as substâncias ativas (Nunes *et al.*, 2000). Os teores de timol encontrados, em cada fração granulométrica, estão em concordância com Leal *et al* (2003) que encontrou, em

TABELA I
Teor de óleo essencial tanto no vegetal fresco como no vegetal dessecado por 100g de amostra de *Lippia sidoides* Cham

| Amostras | Óleo essencial % (m/v) |
|-------------------|------------------------|
| Vegetal fresco | 3,8 |
| Vegetal Dessecado | 5,3 |

TABELA II
Teor de timol da *Lippia sidoides* Cham obtidos de cada fração dos tamises utilizados na análise granulométrica

| Malha do Tamis (mm) | Fração retida na Malha (g) | Teor de Timol (mg/mL) |
|---------------------|----------------------------|-----------------------|
| 2,5 | 6,3 | 2,06 |
| 2,0 | 5,2 | 2,06 |
| 1,6 | 7,6 | 2,06 |
| 1,25 | 7,4 | 2,02 |
| 0,80 | 12,9 | 2,60 |
| 0,50 | 3,5 | 1,92 |
| 0,25 | 3,4 | 2,36 |
| Coletor | 0,8 | 2,09 |

TABELA III
Avaliação da reprodutibilidade das soluções extrativas da *Lippia sidoides* Cham em 5 lotes diferentes

| Lotes das soluções | Volume (Litros) | Timol (mg/mL) ± s | CV (%) |
|--------------------|-----------------|-------------------|----------|
| 1 | 1 | 2,16 ± 0,63 | 3,6889 |
| 2 | 1 | 2,11 ± 0,2 | 1,26652 |
| 3 | 1 | 2,13 ± 0,86 | 1,9955 |
| 4 | 1 | 2,16 ± 0,05 | 0,827815 |
| 5 | 1 | 2,14 ± 0,28 | 3,593839 |

s = Desvio Padrão; CV = Coeficiente de Variação

TABELA IV
Resultados das análises estatísticas para médias repetidas do teor de timol nos 5 lotes de extratos de *Lippia sidoides* Cham

| Fonte da variação | SQ | GI | MQ | Fcalc. | F crítico |
|-------------------|----------|----|----------|----------|-----------|
| Entre Grupos | 1,250667 | 4 | 0,312667 | 1,227749 | 3,47805 |
| Intra Grupos | 2,546667 | 10 | 0,254667 | | |
| Total | 3,797333 | 14 | | | |

TABELA V
Valores da determinação do Resíduo Seco (RS) nos cinco lotes de extratos de *Lippia sidoides* Cham

| Lotes das soluções | Volume (Litros) | RS (%) m/m ± s | CV (%) |
|--------------------|-----------------|----------------|----------|
| 1 | 1 | 2,16 ± 0,63 | 3,6889 |
| 2 | 1 | 2,11 ± 0,2 | 1,26652 |
| 3 | 1 | 2,13 ± 0,86 | 1,9955 |
| 4 | 1 | 2,16 ± 0,05 | 0,827815 |
| 5 | 1 | 2,14 ± 0,28 | 3,593839 |

* Os valores expressados nesta Tabela refere-se a média de três repetições autênticas de cada Lote

seu estudo, durante a floração, valores de $2,0 \pm 0,03$ mg/mL de timol.

A avaliação da reprodutibilidade das soluções extrativas está devidamente relacionada em 5 lotes, e encontra-se descrita na Tabela III. As análises estatísticas para médias repetidas, Tabela IV, demonstraram que não houveram diferenças significativas nos teores de timol nos 5 lotes.

A Tabela V mostra os valores da determinação do Resíduo Seco (RS) nos cinco lotes de extratos. Este parâmetro, segundo Nunes *et al* (2000) apresenta importância tanto na caracterização da matéria-prima como na otimização das soluções extrativas, sendo que os valores observados através das análises de variâncias

TABELA VI

Resultados das análises estatísticas para médias repetidas do Resíduo seco nos 5 lotes de extratos de *Lippia sidoides* Cham

| Fonte da variação | SQ | GI | MQ | Fcalc. | F crítico |
|-------------------|----------|----|----------|---------|-----------|
| Entre Grupos | 0,010493 | 4 | 0,002623 | 1,18014 | 3,47805 |
| Intra Grupos | 0,022227 | 10 | 0,002223 | | |
| Total | 0,03272 | 14 | | | |

TABELA VII

Avaliação da reprodutibilidade dos valores de pH das soluções extrativas de *Lippia sidoides* Cham

| Lotes das soluções | Volume (Litros) | pH \pm s | CV (%) |
|--------------------|-----------------|--------------------|----------|
| 1 | 1 | 6,286 \pm 0,1517 | 2,413299 |
| 2 | 1 | 6,366 \pm 0,2753 | 4,324537 |
| 3 | 1 | 6,213 \pm 0,0602 | 0,968936 |
| 4 | 1 | 6,496 \pm 0,085 | 1,308498 |
| 5 | 1 | 6,333 \pm 0,2272 | 3,587557 |

TABELA VIII

Resultados das análises estatísticas para médias repetidas do pH nos 5 lotes de extratos de *Lippia sidoides* Cham

| Fonte da variação | SQ | GI | MQ | Fcalc. | F crítico |
|-------------------|----------|----|----------|----------|-----------|
| Entre Grupos | 0,13256 | 4 | 0,03314 | 1,026854 | 3,47805 |
| Intra Grupos | 0,322733 | 10 | 0,032273 | | |
| Total | 0,455293 | 14 | | | |

TABELA IX

Atividade Antimicrobiana do extrato padronizado de *Lippia sidoides* Cham frente a quatro cepas de *Streptococcus mutans*, usando o método de difusão em disco e expresso em diâmetro do halo (mm)

| Microrganismos | Extrato de <i>Lippia sidoides</i> | Ciprofloxacino* (1000 μ g/mL) |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Streptococcus mutans</i> IC 01 | 08 | 15 |
| <i>Streptococcus mutans</i> IC 02 | 08 | 18 |
| <i>Streptococcus mutans</i> IC 03 | 11 | 14 |
| <i>Streptococcus mutans</i> IC 04 | 11 | 17 |

* Padrão

TABELA X

Resultados dos ensaios da avaliação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) do extrato padronizado de *Lippia sidoides* Cham

| Microrganismos | Extrato Padronizado de <i>Lippia sidoides</i> Cham | | | | |
|-----------------------------------|--|-----|-----|-----|------|
| | Puro | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 |
| <i>Streptococcus mutans</i> IC 01 | S | S | S | R | R |
| <i>Streptococcus mutans</i> IC 02 | S | S | R | R | R |
| <i>Streptococcus mutans</i> IC 03 | S | S | S | R | R |
| <i>Streptococcus mutans</i> IC 04 | S | S | R | R | R |

* S = Sensível ; R = Resistente

(Anova), Tabela VI, não evidenciaram diferenças significativas de RS nos 5 lotes estudados. O mesmo perfil foi observado, também, para a variável pH, uma vez que os valores observados, a partir dos dados da Tabela VII e VIII, mostram que não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas, ou seja, o valor de F calculado é menor que o valor de F crítico. Os parâmetros estatísticos encontrados, neste estudo, foram determinados a partir do programa Anova-Fator Único Excel/97.

Atividade antimicrobiana do extrato padronizado da *Lippia sidoides* Cham frente ao *Streptococcus mutans*

Após a caracterização da matéria-prima e a padronização do extrato, foi determinada a atividade anti-

microbiana frente ao *Streptococcus mutans*. Os resultados dos ensaios da avaliação preliminar antimicrobiana do extrato estão apresentados nas Tabelas IX e X, respectivamente. No método da difusão em disco, Tabela IX, foi medido um halo de inibição significativo quando comparado com o padrão Ciprofloxacino, o que levou, a partir destes resultados a determinar a CMI deste extrato (Tabela X). Os resultados da CMI demonstrou uma atividade antimicrobiana frente ao *Streptococcus mutans*, porém deve-se fazer um estudo mais aprofundado a cerca da cepa mais sensível ao extrato de *Lippia sidoides* Cham.

Sendo assim, pode-se concluir, a partir deste estudo, que as técnicas de controle de qualidade adotadas, e a determinação da atividade antimicrobiana utilizadas, sugerem que a matéria-prima foi devidamente caracterizada e seu extrato padronizado, podendo assim, ser o mesmo usado na produção de formulações galênicas de uso odontológicos para o combate da cárie dentária em humanos, devido a comprovação de sua atividade antimicrobiana frente ao *streptococcus mutans*, um dos principais agentes etiológicos desta patologia.

REFERÊNCIAS

- Acar, A.C.A.R.; Gold Stain, J.F. Disk susceptibility test in: antibiotics in laboratory medicine 4nd, Baltimore: Willam & Wilkins, p. 01-51, 1996.
- Andrade, C.A.; Peitz, C.; Cúnico, M.; Carvalho, J.L.S.; Abrahão, W.M.; Miguel, O.G.; Miguel, M.D.; Kerber, V.A. Avaliação da atividade antibacteriana e triagem fitoquímica das flores de *Acácia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don Leguminosae-Mimosoideae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15 (1), Jan/Mar, 13-15, 2005.
- Baby, A.R.; Maciel, C.P.M.; Salgado-Santos, I.M.N.; Dias, T.C.S.; Kaneco, T.M.; Consiglieri, V.O.; Velasco, M.V.R. Uso de Extratos de Plantas em Produtos cosméticos. *Cosmetics & Toiletries*, v. 17. Jan-Fev, p. 79-82, 2005.
- Bauer, A. W. Antibiotic susceptibility testing by a standard single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.* v. 45, p. 493, 1966.
- Calvacanti, E.S.B.; Morais, S.M.; Lima, M.A.; Santana, E.W.P. Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 99 (5), p. 541-544, 2004.
- Carvalho, A.F.U.; Melo, V.M.M.; Craveiro, A.A.; Machado, M.I.L.; Bantim, M.B.; Rabelo, E.F. Larvicidal Activity of Essential Oil from *Lippia sidoides* Cham. Against *Aedes aegypti* L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98 (4), p. 569-571, 2003.
- Costa, S.M.O.; Lemos, T.L.G.; Pessoa, O.D.L.; Assunção, J.C.; Braz-Filho, R. Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham) Verbanaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 12. supl. p. 66-67, 2002. *Farmacopéia Brasileira IV*. São Paulo, Andrei editora, 2003.
- Fernandes-Filho, E.S.; Morais, S.M.; Fonseca, S.G.C.; Mota, O.M.L. Preparação e avaliação clínica de um anti-séptico bucal à base do óleo essencial da planta medicinal *Lippia sidoides* Cham (Alecrim pimenta). *Revista da Associação Brasileira de Odontologia*. v. 6, Out/Nov, p. 323-325, 1998.
- Girão, V.C.C.; Nunes-Pinheiro, D.C.S.; Morais, S.M.; Sequeira, J.L.; Gioso, M.A. A clinical trial of the effect of a mouth-rinse prepared with *Lippia sidoides* Cham essential oil in dogs with mild gingival disease. *Preventive Veterinary Medicine*. v. 59, p. 95-102, 2003.
- Junior, V.F.V.; Pinto, A.C. Plantas Medicinais: cura segura?. *Química Nova*. v. 28, n° 3, p. 519-528, 2005.
- Leal, L.K.A.M.; Oliveira, V.M.; Araruna, S.M.; Miranda, M.C.C.; Oliveira, F.M.A. Análise de timol por CLAE na tintura de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta) produzida em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 13, supl., p. 09-11, 2003.
- Kunle, O.; Okogum, L.; Egamama, E.; Emojewwe, E.; Shok, M. Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. *Phytomedicine*. v. 10, p. 59-61, 2003.
- Mesquita, J.M.O.; Cavaleiro, C.; Cunha, A.P.; Lombardi, J.A.; Oliveira, A.B. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de piperaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. V. 15 (1), Jan/Mar, p. 6-12, 2005.
- Nunes, R.S. Desenvolvimento Galênico de Produtos de Uso Odontológico (Creme Dental e enxaguatório Bucal) a Base de *Lippia sidoides* Cham Verbanaceae – Alecrim Pimenta. 1999. 121f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1999.
- Nunes, R.S.; Xavier, H.S.; Rolim Neto, P.J.; Santana, D.P.; Albuquerque, U.P. Padronização Botânica de *Lippia sidoides* Cham. (Verbanaceae). *Acta Farm. Bonaerense*. V19 (2), p. 115-8, 2000.
- Oliveira, R.N.; Dias, I.J.M.; Câmara, C.A.G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. De diferentes localidades de Pernambuco. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. V. 15 (1), Jan/Mar, p. 31-43, 2005.
- Prista, L.V.N., Alves, C.A., Morgado, R.M.R. *Tecnologia Farmacêutica*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian. 1995.