



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

KELY KARINA BELATO

**ANÁLISE *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA,
CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE UM PRINCÍPIO
ATIVO (TIMOL) E DE UM ENXAGUATÓRIO BUCAL
(LISTERINE® ZERO™)**

2014

KELY KARINA BELATO

**ANÁLISE *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA,
CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE UM PRINCÍPIO ATIVO
(TIMOL) E DE UM ENXAGUATÓRIO BUCAL LISTERINE® ZERO™**

Dissertação apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Microbiologia e Imunologia.

Orientador: Profa. Dra. Samira Esteves Afonso Camargo

Co-orientador: Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira

São José dos Campos

2014

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos Campos:
ICT/UNESP; 2014.

Belato, Kely Karina

ANÁLISE *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, CITOTOXICIDADE E
GENOTOXICIDADE DE UM PRINCÍPIO ATIVO (TIMOL) E DE UM
ENXAGUATÓRIO BUCAL (LISTERINE® ZERO™)/ Kely Karina Belato. - São José
dos Campos : [s.n.], 2014.

82 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós- graduação em
Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos,
UNESP - Univ Estadual Paulista, 2014.

Orientadora: Samira Esteves Afonso Camargo

Co-orientadora: Luciane Dias de Oliveira.

1. Biofilme. 2. Testes de Mutagenicidade. 3. Citotoxicidade celular anti-corpo
dependente. I. Camargo, Samira Esteves Afonso, orient. II. Oliveira, Luciane Dias
de, co-orient. III. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos,
UNESP - Univ Estadual Paulista. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho". III. UNESP – Univ Estadual Paulista. IV. Título

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por
qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 15 de dezembro de 2014

E-mail: kely_k@msn.com

Assinatura:

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Samira Esteves Afonso Camargo (Orientadora)
Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP - Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa Dra. Graziella Nuernberg Back Brito
Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP - Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Paula Elaine Cardoso
ECO – Ensino Continuoado em Odontologia
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 15 de dezembro de 2014.

DEDICATÓRIA

Primeiramente a **Deus** que é o grande mestre e Pai, que guia seus filhos pelas veredas da jornada, pelo dom da vida, dos sentidos, da consciência e conhecimento, que mesmo nos momentos de desespero e angústia, nos quais, me sentia impotente e incapaz, de uma forma ou de outra me indicava um caminho a seguir, seja com palavras, com pessoas abençoadas que colocava em meu caminho, ou mesmo com leituras revigorantes. Meu mais sincero obrigado a ti meu Senhor, pela glória de conquistar mais este sonho.

Aos meus pais **Valdenir José Belato** e **Benedita Cicera Vieira Belato**, sem o apoio deles, jamais teria galgado mais esta conquista, sempre me ensinando que com determinação e humildade alcançamos nossos objetivos, sendo espelho de caráter e seriedade em seus atos, me dando exemplo de honestidade e luta para que eu siga a vida com dignidade e sempre respeitando ao próximo. Muito obrigado por possibilitarem a realização de mais um dos meus sonhos, por estarem sempre ao meu lado, me dando apoio e forças para enfrentar todas as dificuldades. Meu mais puro e sincero obrigado, sem vocês eu não seria o que sou hoje. Amo vocês, palavras não seriam suficientes para agradecer toda paciência, dedicação, confiança e amor que expressam por mim.

Aos meus irmãos **Emerson Luis Belato** e **Paulo Henrique Belato**, pelo apoio e ajuda nos momentos mais difíceis.

As minhas sobrinhas **Maria Fernanda Belato e Mariana Belato**, pelo carinho e pelas tardes que passamos juntas, me proporcionando um oásis no deserto que me encontrava.

Aos **meus familiares em geral**, que de alguma maneira ajudaram a seguir em frente e que sempre acreditaram e torceram por mim.

Aos meus cachorrinhos, **Laika, Bruce, Sophia** (*in memoriam*) e **Loren**, que mesmo sem entender o que se passava comigo, sempre estavam ali com todo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

À UNESP - Univ Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Prof. Carlos Augusto Pavanelli e do vice-diretor Prof. Estevão Tomomitsu Kimpara.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal**, na pessoa da coordenadora À Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira, por sempre estar disposta a ajudar quando necessário.

Aos **docentes do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal**.

A minha orientadora **Profa. Dra. Samira Esteves Afonso Camargo** que me aceitou de braços abertos e com o mestrado já em andamento, com tantas turbulências pelo caminho. Me mostrando os caminhos e iluminando minha busca pelo conhecimento. Por sua atenção, dedicação e carinho, pela amizade e principalmente pela paciência, por todos e-mails e mensagens trocadas. Meu mais puro obrigada, sem seu apoio não seria possível alcançar este sonho.

A minha co-orientadora **Profa. Dra Luciane Dias de Oliveira**, que anteriormente era minha orientadora, principalmente por sua paciência, mais também por sua atenção, dedicação, carinho e ética, me guiando e iluminando meus passos na empreitada da ciência.

Aos **docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal**, em especial a **Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira e Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge** pelo convívio paternal e dedicação.

As Profas. Dras. **Graziella Nuernberg Back Brito e Paula Elaine Cardoso** que constituem a banca examinadora.

A CAPES pela concessão de bolsa.

As minhas colegas de turma do mestrado em ordem alfabética **Ana Carolina, Nádia, Rafaella e Tamara** com as quais passei dias agradabilíssimos e sempre estavam dispostas a ajudar.

Ao meu amigo **Jonatas Rafael**, que foi meu anjo amigo, me orientando na parte experimental e no dia a dia da pesquisa, sem seu apoio incondicional não teria alcançado meus objetivos.

A aluna de iniciação científica **Fernanda Saraiva** pela ajuda na parte experimental, e o apoio amigo, importantes para os resultados dessa pesquisa.

Aos alunos de doutorado do programa, **Anna Carolina, Lirían, Michelle, Rodnei**, ao **Felipe Eduardo** em especial que me ensinou e ajudou com o ELISA (seus resultados e gráficos), **Miriam, Fernanda Freire** em especial a **Fernanda Tomé** que me auxiliou em um dos momentos mais difíceis, todos sempre estavam ali para auxiliar quando preciso.

Aos técnicos de laboratório, **Sérgio e Domingos**, sempre à disposição, pela ajuda sempre que preciso e que contribuíram para o desenvolvimento nos experimentos.

Meus mais sinceros agradecimentos a todos que de uma forma geral, por suas contribuições não somente na realização desta pesquisa, mas também na trajetória e evolução de minha vida pessoal.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.

Charles Chaplin

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Timol	15
2.2 LISTERINE®ZERO™	18
2.3 <i>Candida albicans</i>	19
2.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.5 <i>Streptococcus mutans</i>	22
2.6 Biofilme e cultura planctônica	23
3 PROPOSIÇÃO	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Atividade Antimicrobiana	26
4.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM.....	26
4.1.2 Formação de Biofilme monotípico.....	27
4.2 Cultura celular	29
4.3 Análise de Citotoxicidade	30
4.4 Quantificação de TNF- α	33
4.5 Análise de Genotoxicidade	36
4.6 Análise estatística.....	37
5 RESULTADOS	38
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÃO	70
8 REFERÊNCIAS	72

Belato KK. Análise *in vitro* da atividade antimicrobiana, citotoxicidade e genotoxicidade de um princípio ativo (Timol) e de um enxaguatório bucal (LISTERINE® ZERO™) [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

RESUMO

Este estudo se propôs a avaliar a atividade antimicrobiana do princípio ativo Timol e de um enxaguatório bucal (LISTERINE® ZERO™) sobre *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans* e também sua citotoxicidade e genotoxicidade em culturas de macrófagos (RAW 264.7). Após determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Microbicida Mínima (CMM) pelo método de microdiluição em caldo do extrato foi avaliada a ação antimicrobiana do Timol e do LISTERINE® ZERO™ em biofilme. A citotoxicidade do Timol e do LISTERINE® ZERO™ foi avaliada sobre as células pelo método MTT e também pela quantificação de TNF- α pelo método imunoenzimático ELISA. Ainda, a genotoxicidade foi determinada pela formação de micronúcleos nas células após 24 h de exposição ao Timol e 1min ao LISTERINE® ZERO™ e ao etilmetano sulfonato (controle positivo). Os dados foram avaliados pelos testes estatísticos ANOVA e complementado pelo teste de Tukey e Kruskal Wallis (nível de significância de 5%). Obtivemos resultados favoráveis quanto a ação antimicrobiana do princípio ativo para os micro-organismos testados sendo a CMM de 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$ eficaz para *S. mutans* e *S. aureus* e de 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *C. albicans*, para LISTERINE® ZERO™ foi eficaz na concentração de 0,3125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em biofilme apresentou média de 1,85 \pm 0,14 para Timol em *S. mutans*, 1,90 \pm 0,07 para *S. aureus* e 6,66 \pm 0,17 para *C. albicans*. A citotoxicidade do Timol foi observada acima de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e o LISTERINE® ZERO™ foi tóxico para as células; quanto a genotoxicidade não foi observado dano ao nível de DNA. Desta forma concluímos que o princípio ativo Timol, possui ação antimicrobiana em concentrações mais elevadas, no entanto que nestas concentrações possui alta toxicidade celular, e o LISTERINE® ZERO™ possui ação antimicrobiana na menor concentração testada e é citotóxico.

Palavras-chave: Biofilme. Testes de Mutagenicidade. Citotoxicidade Celular Anticorpo-Dependente.

Belato KK. Analysis *in vitro* antimicrobial activity, cytotoxicity and genotoxicity of an active principle (thymol) and a mouthwash (LISTERINE® ZERO™) [dissertation]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the antimicrobial activity of the active ingredient thymol and a mouthwash (LISTERINE® ZERO™) on Candida albicans, Staphylococcus aureus and Streptococcus mutans and also their cytotoxicity and genotoxicity in macrophage cultures (RAW 264.7). After determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum Concentration Microbicide (CMM) by microdilution broth method extract was evaluated the antimicrobial action of thymol and LISTERINE® ZERO™ in biofilm. The cytotoxicity of thymol and LISTERINE® ZERO™ on the cells was evaluated by MTT method and also by quantifying TNF- α by ELISA immunoenzymatic method. Further, genotoxicity is determined by the formation of micronuclei in cells after 24 h of exposure to thymol and the LISTERINE® ZERO™ 1min and ethylmethane sulfonate (positive control). Data were analyzed by ANOVA and Tukey complemented by test and Kruskal Wallis (5% significance level). We obtained favorable results regarding the antimicrobial action of the active ingredient for the microorganisms tested with the CMM 160 mg L⁻¹ effective for S. mutans and S. aureus and 80 mg L⁻¹ for C. albicans to LISTERINE® ZERO™ was effective at levels of 0, 3125 mg L⁻¹, biofilm had a mean of 1.85 ± 0.14 for thymol in S. mutans, 1.90 ± 0.07 to $6.66 \pm$ S. aureus and 0, 17 for C. albicans. The cytotoxicity of thymol was observed above 5 mg L⁻¹, and LISTERINE® ZERO™ was toxic to cells; as genotoxic damage was not observed at the level of DNA. Thus we conclude that the active ingredient thymol, has antimicrobial action in higher concentrations, however that these concentrations has high cellular toxicity, and the LISTERINE® ZERO™ has antimicrobial action in the smallest concentration tested and is cytotoxic

Keywords: Biofilm. Mutagenicity Tests. Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity.

1 INTRODUÇÃO

Com o grande aumento de doenças causadas por agentes infecciosos em seres humanos, torna-se necessário ampliar os estudos analisando bactérias e fungos. Nos últimos anos evidenciou-se um grande aumento na incidência das infecções fúngicas em seres humanos. Estas podem ser tanto superficiais: afetando pele, cabelo, unhas e mucosas, como sistêmicas: envolvendo os principais órgãos do corpo (Ruping et al., 2008).

A boca é considerada um adequado habitat microbiano, pois contém tecidos da mucosa, tecidos duros (dentes), constituindo um ambiente quente e úmido, rico em nutrientes, sendo favorável à proliferação e colonização de muitas espécies (Gilbert et al., 1997). Assim, fatores, como alterações no pH, disponibilidade de nutrientes e temperatura, podem levar a mudanças no equilíbrio microbiano.

Em biofilmes, a situação é diferenciada, uma vez que o complexo estrutural do biofilme permite a estratificação espacial de populações com comunidades mistas, havendo cooperação, sinergismo ou antagonismo entre as espécies (Gilbert et al., 1997).

Pesquisas com plantas medicinais, seja sob a forma de extrato vegetal ou óleo essencial, evidenciam a presença de diversos princípios ativos que apresentam inúmeras atividades biológicas comprovadas por resultados efetivos *in vitro* e *in vivo*, que auxiliam no controle de diversas doenças, tais como: atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, contra protozoários e helmintos, antisséptica, anti-inflamatória, antitumoral, antioxidativa, antialérgica, anticonvulsiva, antidepressiva, anticonceptiva, antimutagênica, analgésica ou diurética

(Navarro et al., 1996; Holetz et al., 2005; Meléndez, Capriles, 2006; Haidari et al., 2009).

Dentre os princípios ativos, podemos citar o Timol que está presente em compostos como a Cavalinha (*Equisetum arvense L.*), Tomilho, Óregano, enxaguatórios orais (LISTERINE® ZERO™), entre outros. O Timol (2-isopropil-5-metilfenol) é um composto fenólico amplamente utilizado como anti-séptico na prática médica devido a sua potente ação fungicida, bactericida e antioxidante (Al-Bandak et al., 2011). Na Odontologia, o Timol é utilizado principalmente no tratamento de infecções orais, na forma de enxaguatório oral e princípio ativo (Magyar et al., 2004).

Assim, o conhecimento científico sobre as propriedades antimicrobianas de alguns princípios ativos provenientes de espécies vegetais pode contribuir para a elaboração de produtos para fins terapêuticos que auxiliem no controle de micro-organismos de interesse médico, particularmente para a Odontologia, uma vez que, pelas condições ambientais da cavidade oral, podem ocorrer infecções e inflamações decorrentes de micro-organismos oportunistas, como *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* e *Candida spp.*

Dentro das propriedades de um princípio ativo é também de extrema importância que este não seja capaz de induzir danos aos tecidos e células no qual entrará em contato.

Desta forma, sabendo que os micro-organismos apresentam crescente perfil de resistência, torna-se de grande interesse analisar a suscetibilidade destes micro-organismos ao princípio ativo Timol e com o enxaguatório bucal LISTERINE® ZERO™. Verificando ainda sua citotoxicidade e genotoxicidade, e a produção de citocina pró-inflamatória por macrófagos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Timol

Estudos realizados com *Equisetum arvense* L., demonstraram ampla ação antimicrobiana desta planta medicinal (Haslam, 1996; Fukai et al., 2002; Machado et al., 2003; Braga LC et al., 2005; Ishida et al., 2009; Pereira et al., 2006; Radulovic et al., 2006; Vasconcelos et al., 2006; Pellati et al., 2009; Santos et al., 2009; Wittscher et al., 2009). Esta atividade antimicrobiana pode estar relacionada aos componentes, principalmente aos princípios ativos desta planta medicinal, especialmente o Timol (Tepe et al., 2004; Pattnaik et al., 1997).

O Timol é um princípio ativo presente em alguns produtos, naturais como o *Equisetum arvense* L. (Cavalinha) e espécies de Tomilho (*Thymus vulgaris*) e Orégano (*Origanum*). (Tepe et al., 2004; Pattnaik et al., 1997).

O Timol (2-isopropil-5-metilfenol) é amplamente utilizado na prática médica, em cosméticos, na agricultura e na indústria alimentar devido a sua potente ação fungicida, bactericida e antioxidante. Também mostra atividade anticoagulante, inibindo fortemente a agregação de plaquetas, podendo ser utilizado na prevenção de trombose e arteriosclerose (Domaracký et al., 2007).

Na Odontologia, o Timol é utilizado principalmente no tratamento de infecções orais (Twetman et al., 1995; Ogaard et al., 1997). Foi demonstrado que têm ação anti-inflamatória eficaz uma vez que diminui a liberação de mediadores inflamatórios como prostanóides, interleucinas, e leucotrienos (Skold et al., 1998).

Os óleos essenciais de muitas espécies de *Thymus* (Timol) são utilizados para fins medicinais, devido às suas propriedades

anti-sépticas, antiespasmódico e antitussígenos. Ainda são utilizados como agentes aromatizantes, no processamento de alimentos e muitas preparações farmacológicas. A análise do óleo bruto resultou na identificação de 39 compostos que representam 93,7% deste óleo, incluindo como os principais componentes o Timol (30,6%), o Carvacrol (26,1%) e o p-cimeno (13,0%) (Tepe et al., 2004).

Šegvić-Klarić et al., (2007) demonstraram a eficácia do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. com presença do Timol puro contra uma variedade de gêneros de fungos *Aspergillus* e *Penicillium* e outros. O óleo essencial de Tomilho teve um CMM de 320 ppm e o Timol puro uma CIM de 300 ppm para *Aspergillus* spp. O Timol e Carvacrol são capazes de desintegrar o exterior da membrana das bactérias Gram-negativas, libertando o LPS, e assim aumentando a permeabilidade do trifosfato de adenosina (ATP) na membrana citoplasmática e, conseqüentemente, alterar a permeabilidade passiva da célula.

Sabe-se que os terpenos, como o Timol, alteram a permeabilidade celular inserindo entre o ácido graxo cadeias que constituem a membrana lipídica (Sanchez et al., 2004; Sikkema et al., 1995) interrompendo assim a captação de lípideos, e causando alterações nas propriedades funcionais da membrana (Sikkema et al., 1995) aumentando a fluidez da membrana e alterando a permeabilidade da mesma.

Vários trabalhos relatam a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas aromáticas com os compostos terpenóides e fenólicos presente neles, como o caso do Timol. O efeito antifúngico dos compostos fenólicos naturais, tais como o Carvacrol, Ácido Cinâmico, Ácido Benzoico, Timol, 2,3 e 2,5-di-hidroxibenzaldeído foram previamente relatados contra *C. albicans* e *C. neoformans*; no entanto, esta bioatividade foi dependente da cepa e do composto testado (Faria et al., 2011). A bioatividade dos fenóis pode ser explicada pelo grupo hidroxilo ligado com um anel de benzeno. Éter metil eugenol, Estragol e p-cimeno

foram os compostos menos ativos contra as cepas de leveduras. Enquanto os compostos Eugenol, Isoeugenol, Carvacrol, Timol, m-cresol e Creosol foram capazes de causar a morte da célula.

Bostancioglu et al., (2012) relataram que três concentrações do óleo essencial *Origanum onites* (125, 250 e 500 g mL⁻¹) podem inibir significativamente a viabilidade celular e a apoptose induzida de células do tecido adiposo endoteliais de ratazana (RATECs) e fibroblastos de ratos (5RP7).

A atividade antibacteriana de monoterpenos fenólicos, como o Timol, está relacionada com o ataque aos fosfolípidos presentes na membrana celular, que causa o aumento da permeabilidade e perda citoplasmática, ou na sua interação com enzimas localizadas na parede da célula (Emiroglu et al., 2010). Assim, a resistência de bactérias Gram-negativas para os monoterpenos fenólicos esta no papel protetor dos lipopolissacarídeos da parede celular ou proteínas de membranas externas, que limita a difusão dos compostos hidrófobos através de sua camada de lipopolissacarídeos (Solorzano-Santos, Miranda-Novales, 2012). No entanto, em concentrações mais elevadas esta camada de polissacarídeo pode ser rompida por óleos essenciais, pois os monoterpenos fenólicos têm a capacidade de perturbar a estrutura lipídica da parede celular de bactérias, o que leva à destruição da membrana celular, vazamento citoplasmático, lise celular, e, finalmente, a morte celular (Emiroglu et al., 2010).

Além disso, o Timol é um agente antifúngico amplamente conhecido (Pina-Vaz et al., 2004; Pauli, 2006). Do ponto de vista biofísico, o comportamento do Timol é anfipático, o que sugere que isto pode afetar a estrutura da membrana celular e da superfície eletrostática, e assim gerar tensão assimétrica na membrana (Pina-Vaz et al., 2004; Pauli, 2006; Ahmad et al., 2013).

O Timol, um dos principais componentes do óleo de Tomilho, tem uma estrutura fenólica e é apontado com uma série de propriedades farmacológicas: antimicrobiana e antifúngica.

Os terpenos, como o Timol, também inibem a respiração de *Candida*, sugerindo efeitos adversos sobre a mitocôndria. Interferem na produção de formas filamentosas viáveis de *C. albicans* durante os primeiros passos da formação de biofilmes. Isto é importante porque a transição de *C. albicans* de planctônicos a formas sésseis e subsequente desenvolvimento do biofilme está associada com um fenótipo resistente (Baille, Douglas, 1999).

2.2 LISTERINE® ZERO™

Em 1879, o LISTERINE® era utilizado principalmente como desinfetante cirúrgico e sua composição consistia em alguns óleos essenciais de Hortelã, Tomilho, Eucalipto e Gualtéria ou alguma outra planta rica em salicilato de metilo. Assim, o LISTERINE® era uma solução saturada de Ácido bórico. (Antunes et al., 2014).

Em 1914, LISTERINE® se torna o primeiro antisséptico a ser vendido nas farmácias de todo os Estados Unidos sem prescrição médica, com aprovação da *American Dental Association*. Atualmente, é a marca de enxaguatório oral mais vendida nos Estados Unidos e em outros mercados (Vlachojannis et al., 2013).

Em 2010, a fabricante Johnson & Johnson lançou uma nova versão deste antisséptico no mercado, o LISTERINE® ZERO™, livre de Etanol, possivelmente devido a controvérsias encontradas na literatura sobre o efeito do álcool em tecidos orais. Portanto, devido ao dano

potencial causado pelo Etanol, o Mentol e Salicilato de metilo também foram substituídos por derivados sintéticos (Antunes et al., 2014).

Uma combinação de Timol (um componente LISTERINE®) com Clorexidina tem sido desenvolvida como um verniz comercialmente disponível, Cervitec (Vivadent, Schaan, Liechtenstein). Tem sido sugerido que Cervitec é especificamente ativo contra *S. mutans* e demonstrou variados graus de sucesso no tratamento da cárie *in vivo* (Haukali, Poulsen, 2003).

2.3. *Candida albicans*

C. albicans predomina como a espécie mais relacionada às candidoses, porém nos últimos anos, observou-se um grande aumento de espécies não-*albicans*, como *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, como causadores de diversas infecções fúngicas (Silva et al., 2012). O aumento ocasional destas espécies emergentes como patógenos humanos pode ser atribuído a uma melhora nos testes de identificação, como o uso de meios cromogênicos, o API e técnicas moleculares, utilizados na rotina de diagnósticos de doenças causadas por micro-organismos patogênicos. No entanto, esta alta prevalência de espécies não-*albicans* poderia ser um reflexo dos altos níveis de resistência às drogas antifúngicas observado no ambiente hospitalar (Silva et al., 2012).

O uso prolongado de antifúngicos no tratamento de infecções causadas por *C. albicans* promoveu a resistência ao azol. Esta resistência azólica adquirida em isolados clínicos de *C. albicans* resulta principalmente na resistência cruzada a vários medicamentos não

relacionados. (White et al., 1998; Franz et al., 1998; Hameed, Fatima, 2013).

C. albicans é considerado parte da microbiota comensal que habita a pele, superfícies da mucosa e o trato gastrointestinal de pessoas saudáveis (MacCallum, 2010). A expressão de seus fatores de virulência pode variar dependendo do tipo de infecção (local ou sistêmica), do estágio da doença e da resposta ao hospedeiro (Naglik et al., 2008). Sabe-se, que a virulência de *C. albicans* está ligada a seus fatores intrínsecos: os principais são a formação de hifas, o dimorfismo, alterações fenotípicas, aderência, persistência, o sinergismo com as bactérias, seus mecanismos de interferência com o sistema de defesa do hospedeiro e a produção de enzimas hidrolíticas, que então contribuem para o desenvolvimento de candidoses. (Hube, 2004).

C. albicans apresenta como fator de virulência a capacidade de transição da levedura para a forma filamentosa (Lo et al., 1997; Saville et al., 2003; Richard et al., 2005). Esta transição mórfica parece importante para a aderência ao tecido e invasão (Saville et al., 2003). *C. albicans* tem a capacidade de formar biofilmes complexos em dispositivos médicos (Kojic, Darouiche, 2004) e na mucosa humana, como a mucosa gastrointestinal e brônquica.

As infecções orais decorrentes de *C. albicans* representam um problema crescente para a saúde. Em indivíduos imunocomprometidos, especialmente aqueles que possuem SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), a candidose causa lesões dolorosas na cavidade oral, e infecções sistêmicas com risco de morte. Além disso, *C. albicans* podem causar infecções persistentes na cavidade oral, como a estomatite (Ryan et al., 2014). Desta forma Braga PC et al., (2007 b) embasados nestes dados, concluem que Timol interfere com a produção de formas filamentosas viáveis de *C. albicans*. Isto é importante porque a formação de hifas é essencial, para um outro aspecto da virulência de *Candida*: o desenvolvimento de biofilme. Tem sido relatado

que a transição de *C. albicans* de levedura para formas de hifas, e subsequente desenvolvimento de biofilme, está associada ao aumento da resistência a drogas antifúngicas (Baillie, Douglas, 1999).

2.4 *Staphylococcus aureus*

S. aureus é um coco Gram - positivo mais isolado da cavidade oral com potencial patogênico. *S. aureus* provoca uma grande variedade de infecções, incluindo doença aguda, crônica e toxina mediada (Chambers, Deleo, 2009). A capacidade deste agente patogênico é devida ao seu arsenal de fatores de virulência, tais como toxinas, antígenos estruturais, adesinas de superfície, matriz de ligação, e enzimas que degradam o tecido (Lowy, 1998).

Na cavidade oral, *S. aureus* é capaz de formar biofilmes que são comunidades envolvidas por uma matriz extracelular. Os polímeros de adesão intercelular são compostos por polissacarídeos (van der Hoeven, Camp, 1993), o que reduz a penetração de antimicrobianos e representam uma barreira terapêutica a muitos antibióticos (DiTizio et al., 1998; Pereira et al., 2013a).

Estes micro-organismos encontram-se na cavidade oral em cerca de 95% dos indivíduos saudáveis e tornaram-se um motivo de preocupação devido esta capacidade de desenvolver resistência à agentes antimicrobianos (Casey et al., 2007).

S. aureus podem causar doenças orais, como a queilite angular, parotidite, mucosite e periodontite (Pereira et al., 2013a). *S. aureus* pode causar ainda infecções endodônticas, osteomielite, abscessos apicais e complicações pós-operatórias após colocação de implantes dentários (Smith et al., 2001; Filoche et al., 2005; Oliveira et al., 2013).

Segundo Pereira et al. (2013A) os gêneros *Candida* e *Staphylococcus* foram isolados com maior frequência na superfície de prótese total superior com e sem lesão por estomatite protética.

Além de doenças orais, estafilococos são agentes causadores de infecções graves na pele e tecidos moles, que são associadas com um risco aumentado de complicações, tais como: bacteremia, pneumonia e endocardite (Smith et al., 2003A).

2.5 *Streptococcus mutans*

S. mutans normalmente está presente na comunidade madura do biofilme dental, porém sob certas condições, pode tornar-se dominante e causar o desenvolvimento de cáries dentárias (Marsh, 2003; Pereira et al., 2013b).

Desta forma, o estreptococo do grupo *mutans*, principalmente a espécie *S. mutans*, é considerado o principal agente etiológico da cárie de superfície dental (Shen et al., 2004). Estes microorganismos causam a hidrólise da sacarose por enzimas Glucosil transferases sintetizando um polissacarídeo extracelular, aderente e insolúvel em água, que lhe permite aderir firmemente à superfície do dente (Ooshima et al., 2000) ou sobre próteses dentárias (Moore et al., 1984).

O acúmulo de estreptococos na superfície dentária é considerado um fator fundamental para o desenvolvimento dos biofilmes cariogênicos devido à produção de ácidos e uma consequente redução do pH oral, conduzindo a uma maior probabilidade de desmineralização do tecido dental (Duarte et al., 2006; Ooshima et al., 2000; Pereira et al., 2011). A colonização da cavidade oral por *S. mutans* também depende de fatores como o fluxo salivar, capacidade tampão da saliva, e da presença

de imunoglobulinas salivares (Barbieri et al., 2007; Ooshima et al., 2000; Oliveira et al., 2013)

2.6 Biofilme e cultura planctônica

Biofilmes são compostos de bactérias ou células fúngicas, envoltos em matriz extracelular composta de polímeros hidratados e detritos. Os biofilmes são amplamente distribuídos na natureza (solo, rochas, ou raízes de plantas), materiais industriais (especialmente sistemas à base de água), e em humanos (comensais ou patogênicos) (Costerton et al., 1999; Zhao et al., 2013).

Muitas infecções crônicas em seres humanos podem estar relacionadas com biofilmes (Zhao et al., 2013). Dentre as doenças associadas ao biofilme estão a periodontite, endocardite e feridas crônicas. A maior parte do conhecimento médico de biofilmes foi derivado de estudos com *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus* (Parsek, Singh, 2003; Zhao et al., 2013).

Os biofilmes também estão associados com o uso de implantes de biomateriais e dispositivos, como intravenosos, próteses, catéteres do trato urinário, protético, válvulas cardíacas, e lentes de contato, muitas vezes resultando em infecção (Parsek, Singh, 2003; Zhao et al., 2013).

Células microbianas que residem em polímeros extracelulares tipicamente ocupam 5% a 30% do volume do biofilme. A espessura ou dimensão dos aglomerados de células em um biofilme pode variar de alguns microns até alguns milímetros. Os nutrientes e resíduos metabólicos podem difundir diretamente através do biofilme ou são

transportados através de canais de água (Stewart, 2003; Davies, 2003; Zhao et al., 2013).

Biofilmes mais maduros são mais resistentes aos antibióticos do que biofilmes mais jovens, menos organizados e, com reduzida sensibilidade aos antibióticos.

Os biofilmes diferem das bactérias em crescimento planctônico em sua estrutura, na expressão gênica, na resistência aos antibióticos e na interação com o hospedeiro (Stewart, 2003; Davies, 2003; Zhao et al., 2013). No entanto, bactérias do biofilme não são apenas fenotipicamente distintas dos seus homólogos planctônicos, mas também são muito mais resistentes aos antimicrobianos do que a sua forma planctônica (Stewart, 2003; Zhao et al., 2013). Em certas condições, as bactérias de biofilme tem uma taxa maior de sobrevivência do que bactéria planctônica (Wolcott et al., 2010; Zhao et al., 2013).

Biofilmes maduros são notoriamente difíceis de erradicar e representam uma fonte de infecções que são muitas vezes ineficientes aos antifúngicos. Isso é intrigante, porque as populações planctônicas da mesma estirpe podem ser susceptíveis a uma grande variedade de antifúngicos.

Desta forma com o surgimento de cepas resistentes a antimicrobianos convencionais a busca por métodos alternativos para o controle de micro-organismos e que sejam viáveis para o consumo torna-se fundamental.

3 PROPOSIÇÃO

Assim, a proposta deste estudo foi avaliar:

- Ação Antimicrobiana

Efetividade de um princípio ativo Timol e de um enxaguatório bucal (LISTERINE® ZERO™) sobre cepas de *S. aureus*, *S. mutans* e *C. albicans* (Cultura planctônica).

Efetividade de um princípio ativo Timol e de um enxaguatório bucal (LISTERINE® ZERO™) sobre cepas de *S. aureus*, *S. mutans* e *C. albicans* (Biofilme).

- Cultura Celular

Efeitos citotóxicos avaliados pela viabilidade celular e produção da citocina (TNF- α) em culturas de macrófagos de camundongos (RAW 264.7).

Efeito genotóxico avaliado pelo teste de micronúcleo em culturas de macrófagos de camundongos (RAW 264.7).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Atividade Antimicrobiana

4.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima- CIM

Foram testados um princípio ativo Timol (Sigma-Aldrich, Brasil) e um enxaguatório bucal (LISTERINE® ZERO™, J & J, Brasil. LOTE 2623 Com - 156951 (em cada 100 mL de LISTERINE® ZERO™ contém 0,06 g de Timol) em culturas planctônicas de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans*. Esse teste foi realizado de acordo com as normas NCCLS (M27-A2) e NCCLS (M7-A6). A cepa padrão de *C. albicans* ATCC 18804 foi semeada em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, USA), e as cepas de *S. aureus* ATCC 6538 e *S. mutans* ATCC 35688 foram semeadas em ágar BHI (Brain Heart Infusion - Himedia, Mumbai, Índia) e incubadas a 37 °C por 24 h, sendo que as cepas de *S. mutans* ficaram sob condições de microaerofilia (5% de CO₂). Após o crescimento, as colônias foram suspensas em 5 mL de solução fisiológica estéril (8,5 g/L NaCL) e submetidas ao agitador vórtex durante 15 s. A seguir, a densidade celular foi ajustada em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) utilizando para *C. albicans* um comprimento de onda de 530 nm e densidade óptica de 0,284; para *S. aureus* 490 nm e densidade de 0,374 e para *S. mutans* um comprimento de onda de 398 nm e densidade de 0,620; acrescentando-se solução fisiológica suficiente para se obter uma concentração equivalente a uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5 (10⁶ células/mL). A partir dessa suspensão-padrão, foi

realizada diluição 1:50 seguida de diluição 1:20 em meio líquido RPMI 1640, resultando em uma suspensão de trabalho contendo 10^5 células/mL, para *C. albicans*, e para as bactérias 10^8 células/mL. Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do princípio ativo Timol, (diluído em DMSO), foram testadas várias concentrações: 0,16; 0,08; 0,04; 0,02; 0,01; 0,005; 0,0025; 0,00125; 0,000625; 0,0003125 mg/mL⁻¹. O LISTERINE® ZERO™ foi utilizado apenas na concentração do fabricante.

As diluições foram realizadas em meio RPMI 1640 para *C. albicans* e em Mueller Hinton para as bactérias. Ao adicionar o meio de cultura específico diluições iniciais foram reduzidas à metade.

A seguir, foram acrescentados 100 µL da suspensão dos micro-organismos padronizados em cada diluição do princípio ativo Timol exposto por 24 h e ao LISTERINE® ZERO™ exposto por 1 min em placas de 96 poços (Costar Corning, Nova York, EUA).

No grupo controle negativo, foram acrescentados 100 µL da suspensão padronizada e 100 µL do RPMI 1640 para *Candida*, e 100 µL de caldo Mueller Hinton para as bactérias em cada poço. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Após incubação por 24 h a 37 °C, para os poços contendo as concentrações de Timol foi realizada a leitura por meio da observação visual da turvação do meio. A CIM foi considerada a menor concentração dos compostos testados, capaz de inibir o crescimento microbiano em caldo. A CMM foi observada após 48 h de exposição. Nos poços contendo LISTERINE® ZERO™ foi observado apenas a CMM após exposição de 1 min.

4.1.2 Formação de Biofilme monotípico

A cepa de *C. albicans* ATCC 18804 foi cultivada a 37 °C

por 24 h em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, EUA), *S. aureus* ATCC 6538 e *S. mutans* ATCC 35688 foram cultivadas a 37 °C em ágar BHI (Brain Heart Infusion - Himedia, Mumbai, Índia), sob condições de microaerofilia (5% de CO₂) para as cepas de *S. mutans*. A seguir, uma alçada da levedura foi inoculada em caldo Yeast Nitrogen Base (YNB - Difco, Detroit, USA) e as bactérias em caldo Triptona de Soja (TSB - Difco, Detroit, USA)

Após 24 h de incubação, que corresponde ao final da fase do crescimento exponencial, o micro-organismo foi centrifugado a 2000 rpm por 10 min e lavado uma vez com 5 mL de solução fisiológica tampão fosfato (PBS). A seguir, foi novamente centrifugado e ressuspendido em caldo Yeast Nitrogen Base (YNB- Difco, Detroit, USA), para as leveduras, e em ágar BHI (Brain Heart Infusion - Himedia, Mumbai, Índia) para as bactérias. As suspensões foram padronizadas na concentração de 10⁷ células/mL em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 530 nm e densidade óptica de 0,381 para *C. albicans*, *S. aureus* com comprimento de onda 490 nm e densidade de 0,447 e *S. mutans* o comprimento de onda de 398 nm e densidade de 0,560. Para formação do biofilme, 250 µL da suspensão dos micro-organismos foram colocadas nos poços da placa de microtitulação de 96 poços (TPP - Suíça). As placas foram incubadas em agitação a uma rotação de 75 rpm (Quimis, Diadema, São Paulo) a 37 °C por 90 min para fase inicial de adesão. Decorrido este período, o caldo foi gentilmente aspirado e cada poço foi lavado com 250 µL de solução fisiológica tampão fosfato (PBS). Esse procedimento foi repetido por 2 vezes para a remoção das células não aderidas. Em seguida foi pipetado 250 µL de YNB (Difco, Detroit, USA) para as leveduras e 250 µL de ágar BHI (Brain Heart Infusion - Himedia, Mumbai, Índia) para as bactérias e as placas foram incubadas a 37 °C por 48 h em agitação (Quimis, Diadema, São Paulo). O caldo foi trocado após 24 h.

Após o período de incubação, o conteúdo da placa com os biofilmes formados foram aspirados. Após esse procedimento o princípio ativo Timol foi adicionado aos biofilmes formados no fundo da placa. As concentrações testadas foram de 0,16; 0,08; 0,04; 0,02; 0,01; 0,005; 0,0025; 0,00125; 0,000625; 0,0003125 mg mL⁻¹.

Os biofilmes permaneceram imersos nas diluições do princípio ativo Timol por 5 min e ao LISTERINE® ZERO™ por 1 min em agitação orbital (Solab, Piracicaba, Brasil). Para o controle negativo sobre os biofilmes foi colocada solução fisiológica tampão fosfato (PBS) pelo mesmo período de tempo. Após a exposição aos agentes testes os poços foram sonicados, utilizando o homogeneizador ultrassônico (Sonics Vibra Cell) com 25% de potência por 30 s. Após a desagregação do biofilme, foi realizado o plaqueamento em duplicata de 100 µL de cada poço em ágar específico ao micro-organismo seguido de incubação por 48 h a 37 °C.

Os testes para contagem de UFC/mL (Unidades formadoras de colônias) do biofilme foram realizados em duplicata, a contagem foi realizada nas placas que apresentaram de 30 a 300 colônias e os valores transformados em logaritmo (Thein et al., 2006).

4.2 Cultura celular

Testes iniciais, resultado rápido, controle das condições fisiológicas (pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de O₂ e CO₂). Grupos com características homogêneas, alta reprodutividade (variáveis minimizadas), custo baixo, e principalmente redução da necessidade de testes em animais, são os principais motivos para avaliar os efeitos biológicos dos materiais em cultura celular.

As células utilizadas para o trabalho foram macrófagos de camundongo (RAW 264.7) provenientes do banco de células da

Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM – RJ). Os macrófagos realizam a morte intracelular do antígeno pelo seu mecanismo especializado e são capazes de recrutar outras células como neutrófilos após produção de várias citocinas. Um funcionamento deficiente dos macrófagos pode alterar a resposta imune inata, levando a várias desordens. Assim, a modulação da atividade dos macrófagos parece ser muito importante na regulação e no bom funcionamento da imunidade inata (Liang et al., 2014). Na glândula mamária de mamíferos, os macrófagos são os principais candidatos para primeira linha de defesa contra bactéria, não só em contato direto com as bactérias invasoras, agindo como uma barreira física para patógenos e alérgenos, como também são capazes de produzir mediadores inflamatórios em resposta a estes micro-organismos (Strandberg et al., 2005; Scull et al., 2010).

Os macrófagos foram cultivados em DMEM (LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Nova York, EUA), e 5 mL de antibiótico (Penicillin Streptomycin – Gibco 15140) em frascos de cultivo celular (TPP, Suíça) e incubados em atmosfera umidificada a 37 °C, 5% de CO₂. Pelo método de exclusão através do azul de Trypan (0,5% Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), que cora membrana rompida (sobrevivência), foi realizada a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer.

4.3 Análise da Citotoxicidade

Para o teste de citotoxicidade, o princípio ativo Timol e o LISTERINE® ZERO™ foram colocados em contato com células de macrófagos de camundongo (RAW 264.7). Uma quantidade de 8×10^3 células foi colocada em cada poço de placas de 96 poços e incubadas por 24 h a 37 °C (Oliveira et al., 2013) (Figura 2). Após este período, o meio

antigo foi removido e acrescentado o princípio ativo diluído em DMSO e em DMEM + 10% SFB, nas concentrações de 160; 80; 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25 e 0,3125 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As placas foram incubadas novamente em estufa com 5% CO_2 a 37 °C por 24 h (Oliveira et al., 2013). O LISTERINE® ZERO™ foi exposto às células por 1 min.

Após este período, a sobrevivência celular foi determinada pela mensuração da atividade da Succinil desidrogenase (SDH). A atividade da SDH, indicativa da atividade do metabolismo mitocondrial, foi mensurada pelo ensaio de MTT (3-4,5 dimetiltiazol-2il - 2,5 - difenil-tetrazólio); Sigma, St Louis, MO, USA. A atividade foi quantificada pela dissolução do MTT em 0,1 N NaOH (6,25 v/v%) em DMSO (Dimethyl Sulfoxide) (Figura 3) e a leitura da densidade óptica resultante da solução foi mensurada em um espectrofotômetro a 570 nm (Bio-Tek, Vermont, EUA).

A citotoxicidade foi expressa como porcentagem em relação ao grupo controle (=100%).

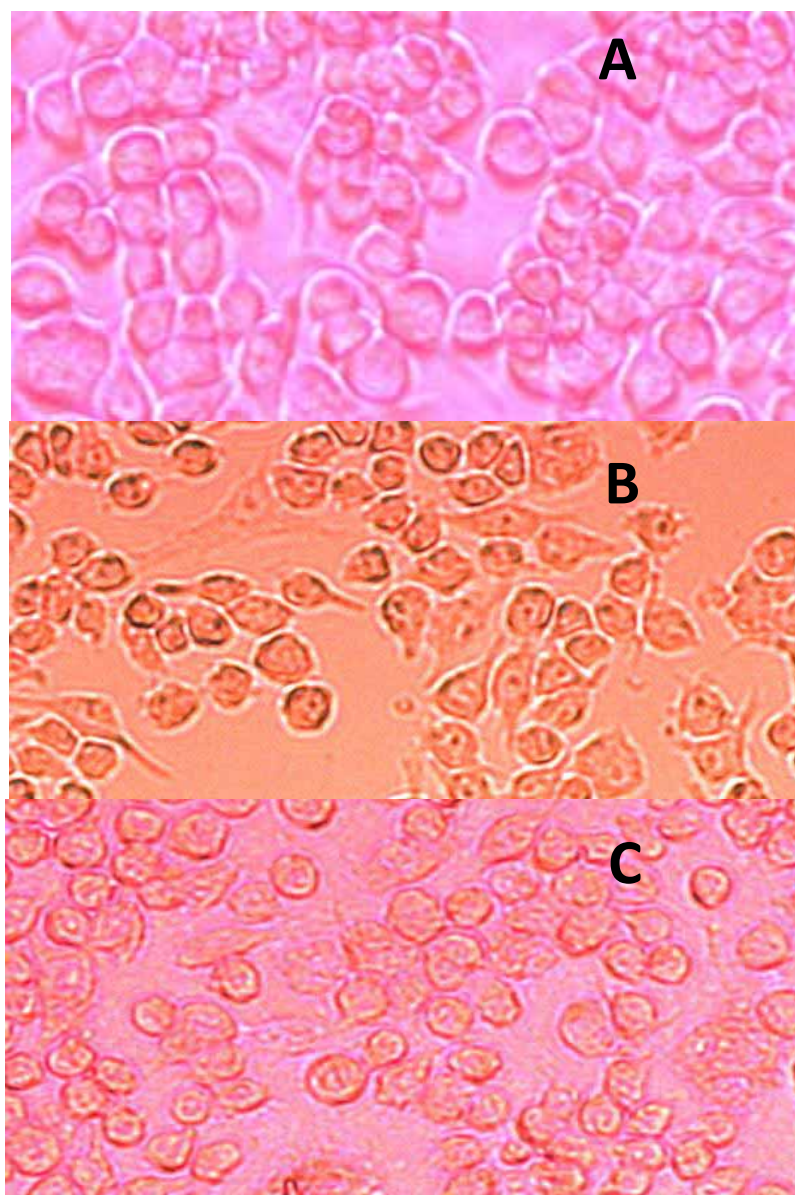


Figura 1- Cultura de macrófagos de camundongo (RAW 264.7). A grupo controle negativo ; B grupo DMSO; C grupo tratamento Timol, aumento de 40x, 24 h após tratamento.

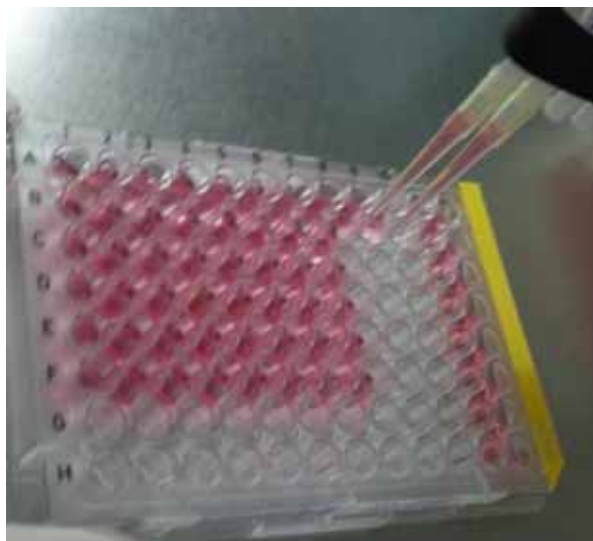


Figura 2- Adição de 200 μ L de DMEM + 10% SFB contendo 8×10^3 células viáveis nos poços da microplaca.

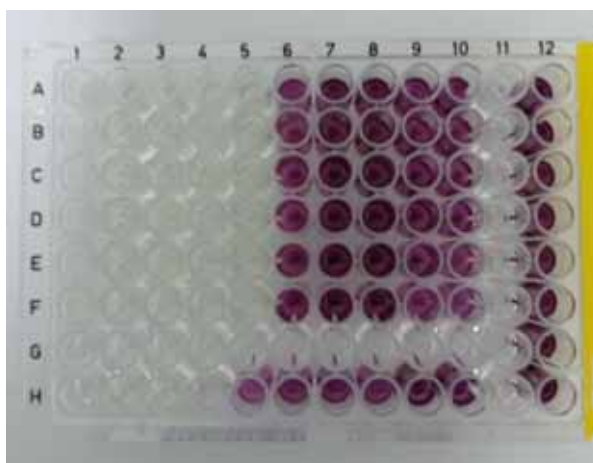


Figura 3- Adição de 100 μ L da solução de MTT nos poços da placa.

4.4 Quantificação de TNF- α

Para a quantificação de citocinas, as células foram cultivadas em microplacas de 24 poços na quantidade de 5×10^5 células viáveis por poço em DMEM + 10% SFB na quantidade suficiente para 1 mL por 24 h a 37 °C (5% de CO₂). Nos grupos tratados, as células foram expostas às concentrações do princípio ativo mais efetivas sobre os

micro-organismos por mais 24 h sob incubação, por 1 min ao LISTERINE® ZERO™ e no grupo controle negativo houve apenas troca do meio de cultura (Oliveira et al., 2013). Após este período foi coletado o sobrenadante de cada poço e congelado separadamente.

A produção desta citocina foi avaliada através de ensaio imunoenzimático (ELISA) com auxílio de Kits comerciais para TNF- α (catálogo DY410) (R & D Systems, Minneapolis, EUA), placas de microtitulação de 96 poços (Nunc) foram sensibilizadas com anticorpo de captura específico para citocina (anti-TNF- α) e mantida *overnight* em temperatura ambiente. No dia seguinte, a placa foi lavada 3 vezes com tampão de lavagem (PBS com 0,05% de Tween 20) e bloqueada com 300 μ L de tampão de bloqueio (PBS com 1% de soro albumina bovina, BSA) por 1 h a temperatura ambiente. Após, foi lavada 3 vezes com tampão de lavagem e receberam 100 μ L dos sobrenadantes da cultura de células e 100 μ L dos padrões de cada citocina com concentrações conhecidas (curva-padrão). Os testes foram realizados em duplicata e a placa mantida por 2 h a temperatura ambiente. Após, a placa foi novamente lavada 3 vezes com tampão de lavagem e foram acrescentados 100 μ L de anticorpos de detecção específico para citocina (anti-TNF- α) marcados com biotina. A placa foi mantida por 2 h em temperatura ambiente. Após lavagem, foi acrescentada Estreptavidina (100 μ L/poço) e a placa foi mantida por 20 min coberta com papel alumínio para evitar luz direta. Após lavagem, a reação foi revelada com 100 μ L/poço de solução contendo substrato cromogênico (Tetrametil benzidina, TMB) e Peróxido de hidrogênio. A placa foi tampada com papel alumínio para evitar a luz direta e mantida em temperatura ambiente por 20 min. Em seguida, foi adicionado em cada poço da placa 50 μ L de solução *stop* (ácido sulfúrico 2 N).

As densidades ópticas foram obtidas em espectrofotômetro de microplacas com comprimento de onda de 450 nm. Após, foram convertidas em concentração de citocinas (pg mL^{-1}), de

acordo com curva-padrão TNF- α com auxílio do programa GraphPad Prism 5.0.

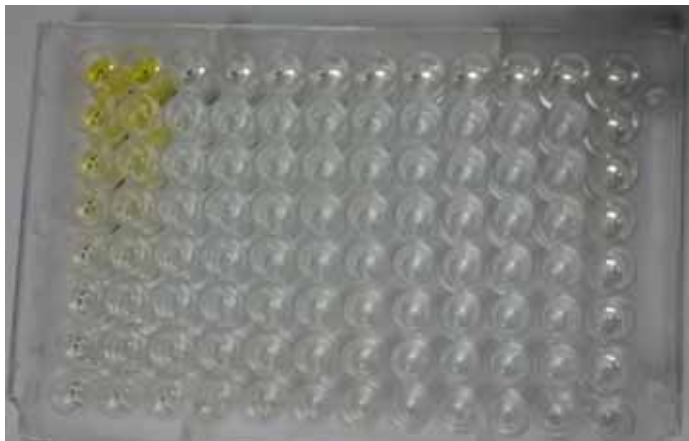


Figura 4 – Curva Padrão da citocina TNF- α .

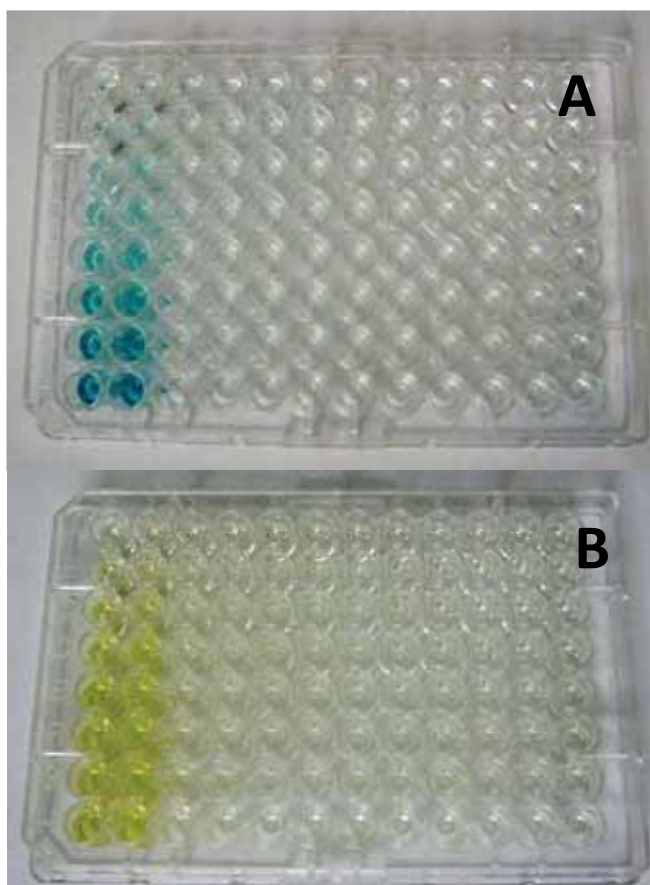


Figura 5- (A) Reação revelada com substrato cromogênico após incubação das amostras com anticorpo de detecção marcado com biotina; (B) Bloqueio da reação revelada com adição do ácido sulfúrico 2N.

4.5 Análise da Genotoxicidade

Os macrófagos (RAW 264.7) foram cultivados em DMEM (LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Nova York, EUA) a 37 °C e 5% CO₂. Então, 3 x 10⁵ células foram cultivadas em lâminas de vidro em 4 mL de meio celular por 24 h a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂. Após este período, as células foram expostas ao princípio ativo Timol diluído em DMSO e em DMEM + 10% SFB, de acordo com as concentrações microbicidas do princípio ativo determinadas no teste microbiológico e ao etilmetano sulfanato EMS; 5 mM (controle positivo) por 24 h, e ao LISTERINE® ZERO™ por 1 min.

As placas foram lavadas em solução salina tamponada (livre de cálcio e magnésio PBS-CMF). As células foram fixadas em Etanol 100% por 30 min e foram lisadas em 5 N HCl por 40 min, lavadas com água deionizada e coradas com reagente SCHIFF (Sigma) por 30 min em temperatura ambiente. Após lavagem em sulfato/água por 6 min e em água corrente por 10 min, as células foram desidratadas e montadas com Entellan (Merck). Os micronúcleos foram analisados em microscópio de imersão (100X), sendo que foram avaliadas 1.000 células/placa por concentração em pelo menos dois experimentos independentes. Os micronúcleos foram identificados como estruturas de DNA contidas no citoplasma claramente separadas do núcleo principal, cercadas por uma membrana nuclear, e incluindo uma área menor que 1/3 da área do núcleo principal. Somente as células mononucleadas contendo menos que cinco micronúcleos foram contadas; células em mitose e que exibiam fragmentação nuclear por apoptose não foram contadas.

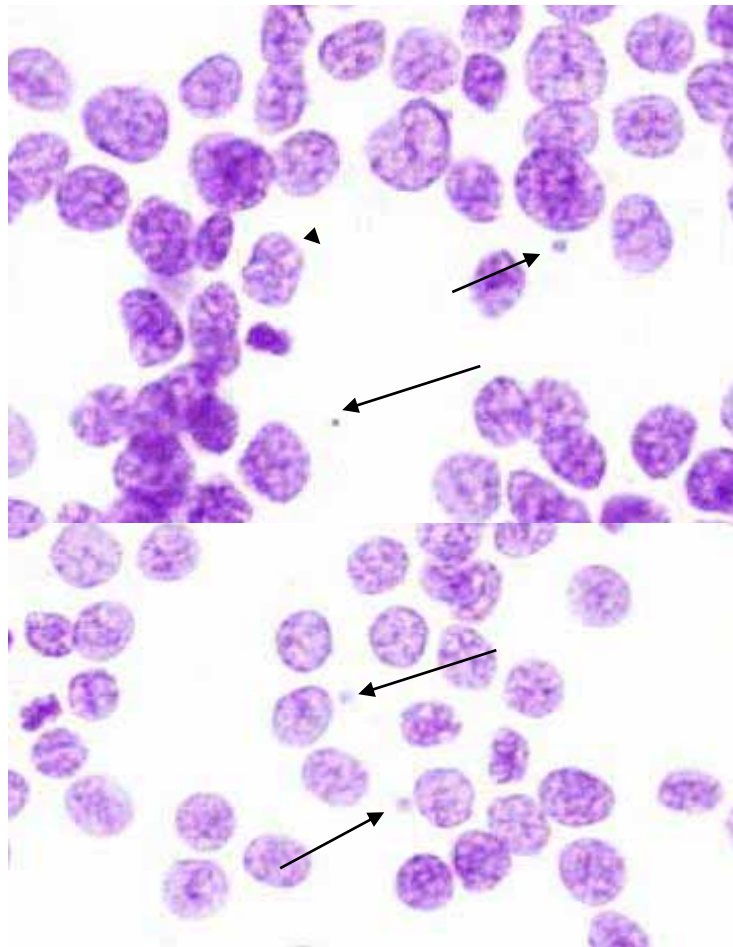


Figura 6- Cultura de macrófagos de camundongo (RAW 264.7), grupo controle (EMS) com presença de micronúcleos indicados pelas setas. Foto retirada com leitor de lâminas (Pannoramic DESK).

4.6 Análise estatística

Os dados obtidos nos testes de citotoxicidade e genotoxicidade foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA, complementado pelo teste Tukey e Kruskal Wallis respectivamente, com significância de 5% ($p \leq 0.05$), através do programa estatístico BioEstat 5.0

5 RESULTADOS

5.1 Atividade Antimicrobiana

5.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM

A tabela 1 mostra a concentração inibitória mínima e microbicida mínima do princípio ativo Timol para os três micro-organismos avaliados deste estudo após exposição de 24 h. A tabela 2 mostra a concentração microbicida mínima após exposição de 5 min ao princípio ativo Timol.

Tabela 01 - Valores em mg mL⁻¹ da CIM e CMM do Timol (princípio ativo), para os micro-organismos avaliados após contato de 24 h

Micro-organismo	Concentração do Timol (mg mL ⁻¹)						
	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01	0,005	0,0025
<i>C. albicans</i>					□	■	
<i>S. aureus</i>	□	■					
<i>S. mutans</i>	■□						

■CIM - Concentração Inibitória Mínima

□CMM - Concentração Microbicida Mínima.

Verificou-se que em cepas de *C. albicans* a concentração de 0,01 mg mL⁻¹ eliminou 100% das cepas, nas concentrações de 0,005 e 0,0025 mg mL⁻¹ os percentuais de eliminação foram menores. Em concentrações inferiores a 0,0025 mg mL⁻¹ não foi comprovada atividade microbicida. Com isso a CMM do princípio ativo Timol para *C. albicans* após exposição de 24 h foi de 0,01 mg mL⁻¹.

Em cepas de *S. aureus* a concentração de 0,16 mg mL⁻¹ eliminou 100% das cepas, já nas concentrações de 0,08 e 0,04 mg mL⁻¹ os percentuais de eliminação foram menores. Em concentrações inferiores a 0,04mg mL⁻¹ não foi comprovada atividade microbicida. Com isso a CMM do princípio ativo Timol para *S. aureus* após exposição de 24 h foi de 0,16 mg mL⁻¹.

Em cepas de *S. mutans* a concentração de 0,16 mg mL⁻¹ eliminou 100% das cepas, já nas concentrações de 0,08 e 0,04 mg mL⁻¹ os percentuais de eliminação foram menores. Em concentrações inferiores a 0,04 mg mL⁻¹ não foi comprovada atividade microbicida. Assim a CMM do princípio ativo Timol para *S. mutans* com exposição de 24 h foi de 0,16 mg mL⁻¹.

Tabela 02 - Valores em mg mL⁻¹ da CMM do Timol (princípio ativo), para os micro-organismos após contato de 5 min

Micro-organismo	Concentração (mg mL ⁻¹)						
	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01	0,005	0,0025
<i>C. albicans</i>		■					
<i>S. aureus</i>		■					
<i>S. mutans</i>	■						

■CMM- Concentração Microbicida Mínima

Verificou-se que em cepas de *C. albicans* a concentração de 0,08 mg mL⁻¹ eliminou 100% das cepas, já nas concentrações de 0,04 e 0,02 mg mL⁻¹ os percentuais de eliminação foram menores. Em concentrações inferiores a 0,02 mg mL⁻¹ não foi comprovada atividade microbicida. Assim a CMM do princípio ativo Timol para *C. albicans* após exposição de 5 min foi de 0,08 mg mL⁻¹.

Em cepas de *S. aureus* a concentração de 0,08 mg mL⁻¹ eliminou 100% das cepas, já nas concentrações de 0,04 e 0,02 mg mL⁻¹

os percentuais de eliminação foram menores. Em concentrações inferiores a $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$ não foi comprovada atividade microbicida. Assim a CMM do princípio ativo Timol para *S. aureus* após exposição de 5 min foi de $0,08 \text{ mg mL}^{-1}$.

Em cepas de *S. mutans* a concentração de $0,16 \text{ mg mL}^{-1}$ eliminou 100% das cepas, já nas concentrações de $0,08$ e $0,04 \text{ mg mL}^{-1}$ os percentuais de eliminação foram menores. Em concentrações inferiores a $0,04 \text{ mg mL}^{-1}$ não foi comprovada atividade microbicida. Assim a CMM do princípio ativo Timol para *S. mutans* com exposição de 5 min foi de $0,16 \text{ mg mL}^{-1}$.

As tabelas 3 e 4 mostram a concentração inibitória mínima e microbicida mínima do DMSO para os três micro-organismos após exposição de 24 h e a concentração microbicida mínima após 5 min de exposição respectivamente.

Tabela 03 - Valores em mg mL^{-1} da CIM e CMM do DMSO para os micro-organismos após contato 24 h

Micro-organismo	Concentração (mg mL^{-1})						
	0,16	0,08	0,40	0,02	0,01	0,005	0,0025
<i>C. albicans</i>	■	□					
<i>S. aureus</i>	■	□					
<i>S. mutans</i>	■	□					

■ CIM- Concentração Inibitória Mínima

□ CMM- Concentração Microbicida Mínima

Verificou-se que em cepas de *C. albicans* a concentração de $0,16 \text{ mg mL}^{-1}$ eliminou 100% das cepas, já nas concentrações de $0,08$ e $0,04 \text{ mg mL}^{-1}$ os percentuais de eliminação foram menores. Em concentrações inferiores a $0,04 \text{ mg mL}^{-1}$ não foi comprovada atividade

microbicida. Com isso a CMM do veículo diluente DMSO para *C. albicans* após exposição de 24 h foi de 0,16 mg mL⁻¹.

Em cepas de *S. aureus* a concentração de 0,16 mg mL⁻¹ eliminou 100% das cepas, já nas concentrações de 0,08 e 0,04 mg mL⁻¹ os percentuais de eliminação foram menores. Em concentrações inferiores a 0,04 mg mL⁻¹ não foi comprovada atividade microbicida. Assim a CMM do veículo diluente DMSO para *S. aureus* após exposição de 24 h foi de 0,16 mg mL⁻¹.

Em cepas de *S. mutans* a concentração de 0,16 mg mL⁻¹ eliminou 100% das cepas, já nas concentrações de 0,08 e 0,04 mg mL⁻¹ os percentuais de eliminação foram menores. Em concentrações inferiores a 0,04 mg mL⁻¹ não foi comprovada atividade microbicida. Assim a CMM do agente diluente DMSO para *S. mutans* após exposição de 24 h foi de 0,16mg mL⁻¹.

Tabela 04 - Valores em mg mL⁻¹ da CMM do DMSO para os micro-organismos avaliados após contato de 5 min

Micro-organismo	Concentração (mg mL ⁻¹)					
	0,16	0,04	0,02	0,01	0,005	0,0025
<i>C. albicans</i>	□					
<i>S. aureus</i>	□					
<i>S. mutans</i>	□					

□CMM- Concentração Microbicida Mínima deve ser (<) 0,16 mg mL⁻¹.

Dentre as cepas de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* tratadas com agente diluente DMSO em exposição por 5 min, nenhuma apresentou atividade microbicida nas diluições testadas, sugerindo que seja realizado testes com concentrações inferiores a 0,16 mg mL⁻¹.

A tabela 5 exibe a CMM ao LISTERINE® ZERO™ após exposição de 1 min para os três micro-organismos estudados.

Tabela 05: Valores em mg mL⁻¹ da CMM de LISTERINE® ZERO™ para os micro-organismos após contato de 1 min.

Micro-organismo	Concentração (mg mL ⁻¹)						
	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01	0,005	0,0003125
<i>C. albicans</i>							<input type="checkbox"/>
<i>S. aureus</i>							<input type="checkbox"/>
<i>S. mutans</i>							<input type="checkbox"/>

CMM – Concentração Microbicida Mínima

As cepas de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* expostas ao LISTERINE® ZERO™ por 1 min, apresentaram atividade microbicida em todas as diluições testadas, sendo a CMM para as cepas citadas a diluição de 0,0003125 mg mL⁻¹

5.1.2 Formação de Biofilme monotípico.

A atividade antimicrobiana para o biofilme está demonstrada na figura 7 e na tabela 6.

Após análise estatística, pode-se verificar que, para *Candida albicans*, o tratamento com a diluição do agente teste Timol na concentração 160 µg mL⁻¹ demonstrou redução significativa de UFC/mL, como ilustrado na figura 7 A. O agente utilizado para sua diluição DMSO não demonstrou diferença significante ($p < 0.05$), já a comparação entre os demais tratamentos: Controle x LISTERINE® ZERO™, DMSO x Timol,

DMSO x LISTERINE® ZERO™ e Timol x LISTERINE® ZERO™ apresentaram diferença significativa ($p < 0.05$).

Para *S. aureus*, como ilustrado na Figura 7 B, o tratamento com a diluição do agente teste Timol na concentração $160 \mu\text{g mL}^{-1}$ demonstrou redução significativa de UFC/mL. O agente utilizado para sua diluição DMSO não demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre o controle e o tratamento com LISTERINE® ZERO™. Já a comparação entre os demais tratamentos: Controle x LISTERINE® ZERO™, DMSO x Timol, Timol x LISTERINE® ZERO™ apresentaram diferença significativa ($p < 0.05$).

Para *S. mutans*, como ilustrado na Figura 7 C, o tratamento com a diluição do agente teste Timol na concentração $160 \mu\text{g mL}^{-1}$ demonstrou redução significativa de UFC/mL. O agente utilizado para sua diluição DMSO não demonstrou diferença significativa ($p < 0.05$) entre o controle e o tratamento com LISTERINE® ZERO™. Já a comparação entre os demais tratamentos: Controle x LISTERINE® ZERO™, DMSO x Timol, Timol x LISTERINE® ZERO™ apresentaram diferença significativa ($p < 0.05$).

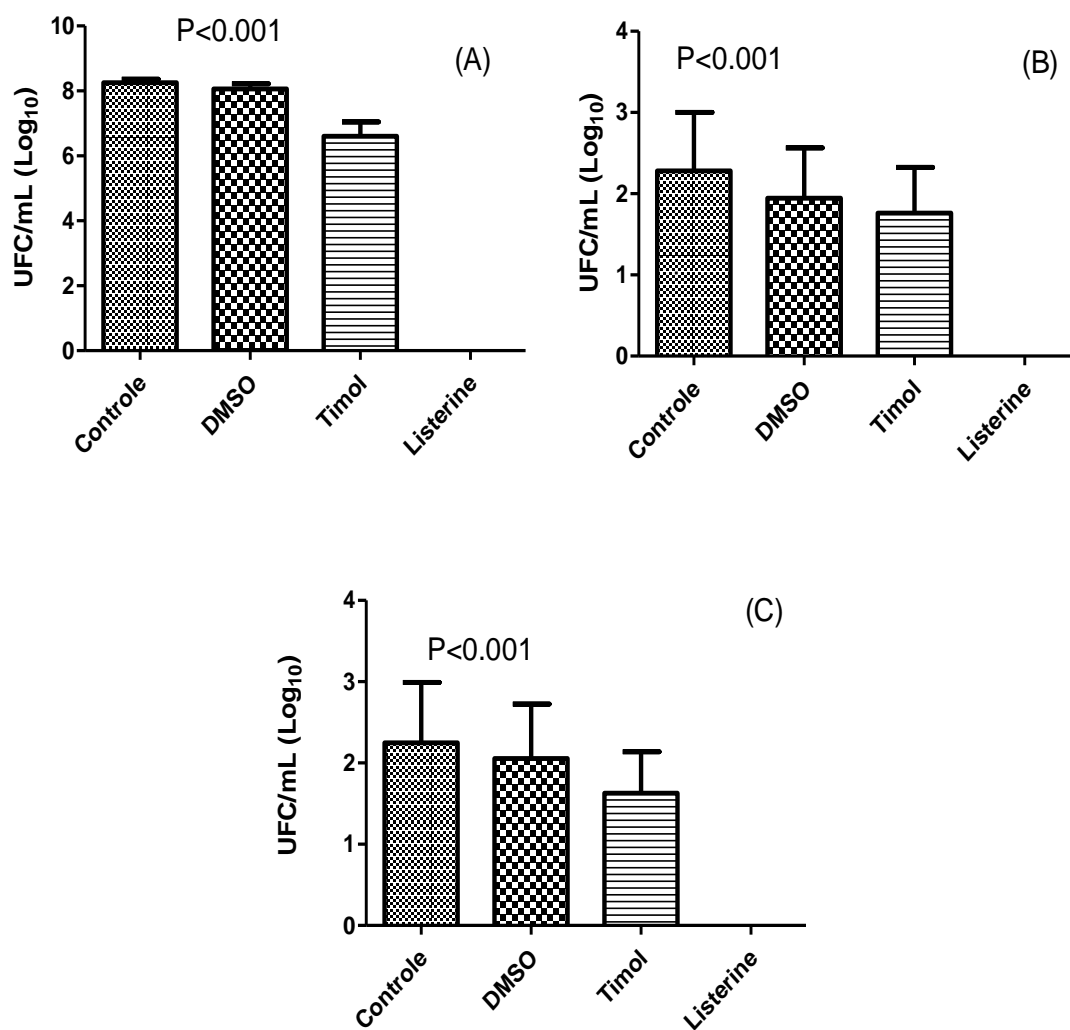


Figura 7- UFC mL⁻¹ (Log 10). A) *Candida albicans*; B) *Staphylococcus aureus*; C) *Streptococcus mutans*

Tabela 6 - Média e desvio padrão dos valores de UFC mL⁻¹ (Log₁₀) de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*

Tratamento	Média e desvio padrão
<i>Candida albicans</i>	
Controle	8,29 ± 0,11
DMSO	8,08 ± 0,20
Timol	6,66 ± 0,17
LISTERINE® ZERO™	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	
Controle	2,38 ± 0,35
DMSO	2,10 ± 0,10
Timol	1,90 ± 0,07
LISTERINE® ZERO™	0
<i>Streptococcus mutans</i>	
Controle	2,47 ± 0,005
DMSO	2,25 ± 0,03
Timol	1,85 ± 0,14
LISTERINE® ZERO™	0

5.2 Cultura celular

5.2.1 Análise de Citotoxicidade

A análise de citotoxicidade para as células de macrófago (Raw 246.7) está demonstrado na figura 2 e 3 e na tabela 7,8,9 e 10.

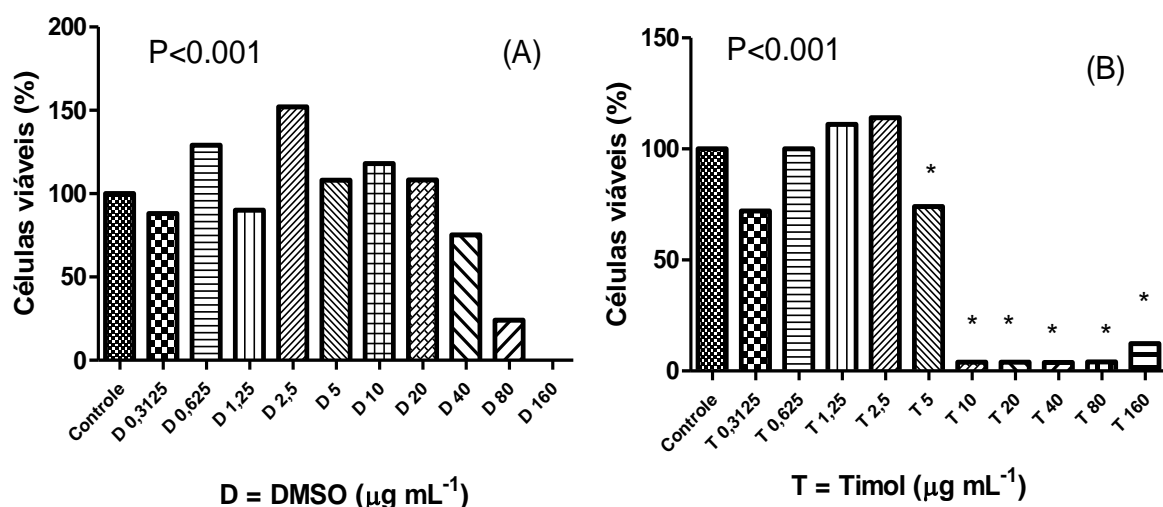


Figura 8 - A citotoxicidade DMSO; B citotoxicidade Timol. (24 h).

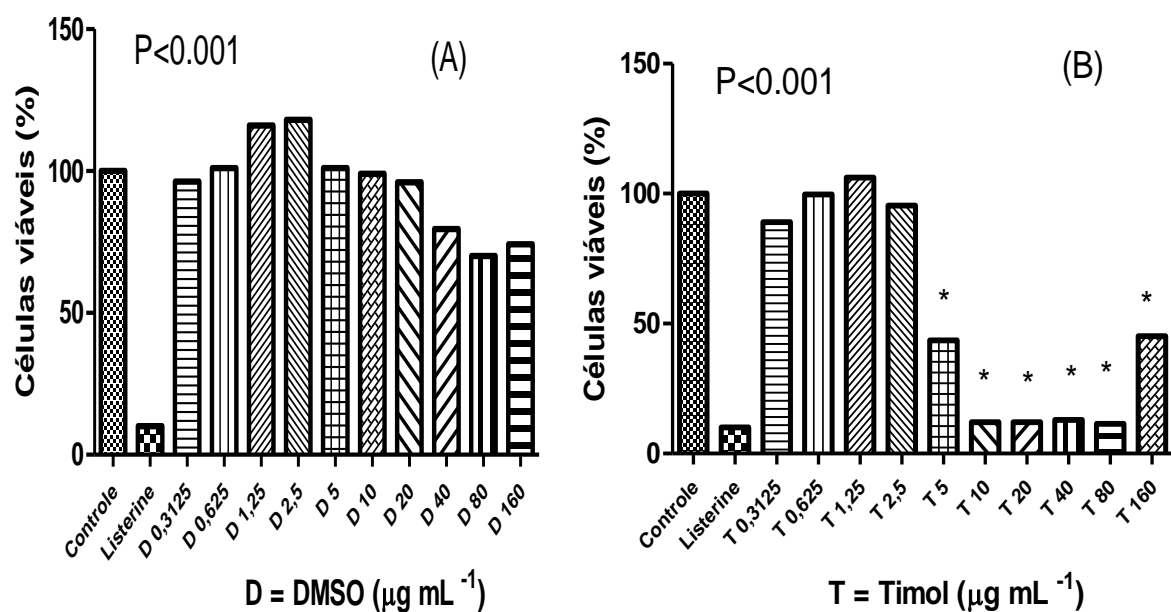


Figura 9 - A citotoxicidade DMSO e LISTERINE® ZERO™; B Timol e e ao LISTERINE® ZERO™ (1 min).

Tabela 07 - Valores médios, desvio padrão para viabilidade celular (%) do princípio ativo Timol, exposição de 24 h

Diluições ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média e desvio padrão DO	%
Controle -	1,5 \pm 0,10	100 \pm 6,6
160	0,18 \pm 0,03	12,31 \pm 2,1
80	0,06 \pm 0	4,06 \pm 0
40	0,05 \pm 0,05	3,80 \pm 3,8
20	0,05 \pm 0,08	3,93 \pm 6,3
10	0,05 \pm 0,04	3,93 \pm 3,1
5	1,10 \pm 0,14	74 \pm 9,4
2,5	1,70 \pm 0,19	114 \pm 12,7
1,25	1,66 \pm 0,18	111 \pm 12
0,625	1,5 \pm 0	100 \pm 0
0,3125	1,08 \pm 0,18	72 \pm 12

Tabela 08 - Valores médios, desvio padrão para viabilidade celular (%) do princípio ativo Timol, exposição de 5 min

Diluições ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média e desvio padrão DO	%
Controle	1,50 \pm 0,10	100 \pm 6,6
LISTERINE® ZEROTM	0,05 \pm 0,01	10 \pm 2
160	0,22 \pm 0,03	45,15 \pm 6,1
80	0,05 \pm 0,07	11,40 \pm 16
40	0,06 \pm 0,03	12,90 \pm 6,5
20	0,05 \pm 0,08	12,05 \pm 19,3
10	0,05 \pm 0,04	12 \pm 9,6
5	0,21 \pm 0,04	43,50 \pm 8,3
2,5	0,47 \pm 0,01	95,40 \pm 2
1,25	0,53 \pm 0,01	106,20 \pm 2
0,625	0,49 \pm 0,02	99,65 \pm 4
0,3125	0,44 \pm 0,07	89,05 \pm 14

Tabela 09 - Valores médios, desvio padrão para viabilidade celular (%) do veículo diluente DMSO, exposição de 24 h

Diluições ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média e desvio padrão DO	%
Controle	1,50 \pm 0,10	100 \pm 6,6
160	0,06 \pm 0	24,1 \pm 0
80	0,05 \pm 0	75,3 \pm 0
40	0,05 \pm 0	108 \pm 0
20	0,07 \pm 0	108,3 \pm 0
10	0,63 \pm 0	118 \pm 0
5	0,97 \pm 0	108 \pm 0
2,5	1,14 \pm 0	152 \pm 0
1,25	1,03 \pm 0	90 \pm 0
0,625	1,26 \pm 0	129 \pm 0
0,3125	1,31 \pm 0	88 \pm 0

Tabela 10 - Valores médios, desvio padrão para viabilidade celular (%) do veículo diluente DMSO, exposição de 5 min

Diluições ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média e desvio padrão DO	%
Controle	1,50 \pm 0,10	100 \pm 6,6
LISTERINE® ZEROTM	0,05 \pm 0,01	10 \pm 2
160	0,37 \pm 0,09	74,20 \pm 18
80	0,34 \pm 0,05	70 \pm 10
40	0,39 \pm 0,05	79,50 \pm 10,2
20	0,47 \pm 0,03	96 \pm 6
10	0,49 \pm 0,04	99 \pm 8
5	0,50 \pm 0,02	101 \pm 4
2,5	0,59 \pm 0,03	118 \pm 6
1,25	0,57 \pm 0,07	116 \pm 14
0,625	0,50 \pm 0,01	101 \pm 2
0,3125	0,48 \pm 0,02	96,25 \pm 4

Para o princípio ativo Timol foi constatada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre os grupos pesquisados (controle e tratados). Após 24 h de exposição com as diluições do princípio ativo de *E. arvense* L. (Cavalinha) Timol, houve diminuição da viabilidade celular em todos os grupos tratados, em comparação ao grupo controle (100% viável) ($p > 0,01$).

A concentração com maior percentual de células sobreviventes foi a do grupo tratado com $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, apresentando em média 114% de viabilidade celular, sendo estatisticamente diferente dos demais grupos tratados ($p < 0,01$), bem como do grupo controle (100% viável) ($p < 0,01$).

Os grupos que receberam as doses de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$, $40 \mu\text{g mL}^{-1}$, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ do princípio ativo Timol foram estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$) e apresentaram as menores taxas de sobrevivência celular, 4,06%, 3,80%, 3,93% e 3,83% respectivamente, diferindo significativamente dos demais grupos tratados ($p < 0,01$). Em relação ao grupo controle demonstraram significativa redução em sua viabilidade celular ($p < 0,01$).

Após 5 min de exposição com as diluições do princípio ativo de *E. arvense* L. (Cavalinha) Timol, houve diminuição da viabilidade celular em praticamente todos os grupos tratados, em comparação ao grupo controle (100% viável) ($p > 0,01$). Foi constatada diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) entre os grupos pesquisados (controle e tratados).

A concentração com maior percentual de células sobreviventes foi a do grupo tratado com $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, apresentando em média 106,20% de viabilidade celular, sendo estatisticamente diferente dos demais grupos tratados ($p < 0,01$), bem como do grupo controle (100% viável) ($p < 0,01$).

Os grupos que receberam as doses de 80, 40, 20, e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ do princípio ativo Timol foram estatisticamente semelhantes entre si

($p > 0,05$) e apresentaram as menores taxas de sobrevivência celular, 11,40%, 12,90%, 12,05% e 12% respectivamente, diferindo significativamente dos demais grupos tratados ($p < 0,01$). Em relação ao grupo controle demonstraram significante redução em sua viabilidade celular ($p < 0,01$).

Em comparação com o tratamento utilizando Timol com exposição de 24 h, os resultados são semelhantes, demonstrando uma diminuição significativa nas diluições 160, 80, 40, 20 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, diferindo na diluição 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ onde na exposição 24 h apresentou 74% de viabilidade celular e com 5 min apenas 43,50%. Nas diluições 2,5, 1,25; 0,625 e 0,3125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou taxas altas de viabilidade celular em ambos os tratamentos.

Para o diluente DMSO foi constatada diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) entre os grupos pesquisados (controle e tratados). Após 24 h de exposição com as diluições do agente diluente DMSO, houve diminuição da viabilidade celular em alguns dos grupos tratados, em comparação ao grupo controle (100% viável) ($p > 0,01$).

A concentração com maior percentual de células sobreviventes foi a do grupo tratado com 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, apresentando em média 152% de viabilidade celular, sendo estatisticamente diferente dos demais grupos tratados ($p < 0,01$), bem como do grupo controle (100% viável) ($p < 0,01$).

O grupo que recebeu a dose de 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$, do agente diluente DMSO apresentou a menor taxa de sobrevivência celular, 24,1%, diferindo significativamente dos demais grupos tratados ($p < 0,01$). Em relação ao grupo controle demonstrando significante redução em sua viabilidade celular ($p < 0,01$). Já os demais tratamentos apresentaram taxas elevadas de viabilidade celular.

Após 5 min de exposição com as diluições do agente diluente DMSO, houve pequena diminuição da viabilidade celular em alguns dos grupos tratados, em comparação ao grupo controle (100%

viável) ($p > 0,01$). Foi constatada diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) entre os grupos pesquisados (controle e tratados).

A concentração com maior percentual de células sobreviventes foi a do grupo tratado com $1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$, apresentando em média 116% de viabilidade celular, sendo estatisticamente diferente dos demais grupos tratados ($p < 0,01$), bem como do grupo controle (100% viável) ($p < 0,01$).

Os tratamentos apresentaram taxas elevadas de viabilidade celular. Em comparação com o tratamento utilizando DMSO com exposição de 24 h, os resultados são semelhantes, diferindo apenas na diluição $160 \mu\text{g mL}^{-1}$, que apresentou redução significativa estatisticamente no tratamento com exposição de 24 h. Nas demais diluições apresentou taxas altas de viabilidade celular em ambos os tratamentos.

Para o LISTERINE® ZERO™ foi constatada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre os grupos pesquisados (controle e tratados). Após 1 min de exposição com LISTERINE® ZERO™, houve significativa diminuição da viabilidade celular em todos os grupos tratados, em comparação ao grupo controle (100% viável) ($p > 0,01$).

Os valores obtidos foram de 10% para todo o grupo tratado com LISTERINE® ZERO™. Apresentando em média 10% de viabilidade celular, sendo estatisticamente igual ao grupo tratado ($p < 0,01$); bem como do grupo controle (100% viável) ($p < 0,01$).

O tratamento apresentou taxas reduzidas de viabilidade celular, com apenas 10% de viabilidade celular, demonstrando que o LISTERINE® ZERO™, produz uma ação citotóxica sobre as células de macrófago RAW 246.7.

5.2.2 Quantificação de TNF- α

Os valores médios e desvios-padrão (pg/mL) obtidos da produção de TNF- α por macrófagos após 24 h de exposição às concentrações do princípio ativo Timol e LISTERINE® ZERO™ por 1 min estão demonstrados nas tabelas 11 e na figura 10.

Tabela 11- Valores médios e desvios-padrão obtidos na produção de TNF- α (pg mL⁻¹) por macrófagos após 24 h de exposição às concentrações do princípio ativo Timol e 1 min para LISTERINE® ZERO™

($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média e desvio Padrão (pg mL ⁻¹)	Grupos Homogêneos
2,5	6,33 \pm 10,78	A
1,25	15,66 \pm 15,42	AB
0,625	22,60 \pm 11,29	B
0,3125	26,19 \pm 11,44	B
LISTERINE® ZERO™	97,48 \pm 30,02	C
Controle	9,44 \pm 7,05	AB

Comparação aos demais grupos tratados e também ao grupo controle ($p < 0,05$).

Pode-se verificar que o LISTERINE® ZERO™ apresentou os maiores valores da produção de TNF- α , com diferença significativa em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Já o Timol (em diferentes concentrações) apresentou valores mais baixos da produção de TNF- α

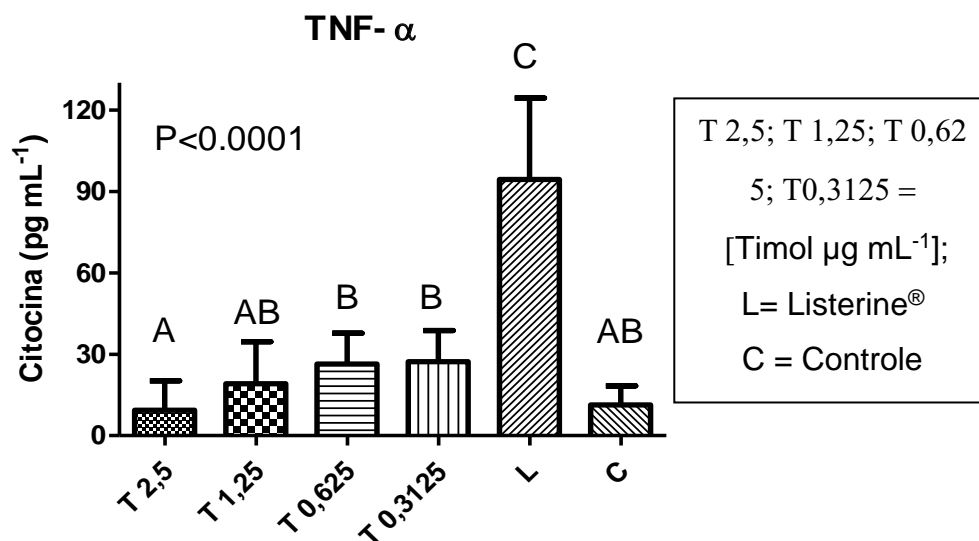


Figura 10 - Quantificação de citocina TNF- α .

5.2.3 Análise de Genotoxicidade

A formação de micronúcleos pelas diluições mais efetivas do princípio ativo Timol e LISTERINE® ZERO™ testados foi analisada em cultura de células macrófagos (RAW 264.7). Os micronúcleos são identificados como estruturas contendo DNA no citoplasma. Células mononucleadas contendo menos que cinco micronúcleos foram contados, já células em mitose e as que exibiam fragmentação nuclear por apoptose não foram contadas.

Os tratamentos Timol e LISTERINE® ZERO™ não foram capazes de aumentar o número de micronúcleos significativamente em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$) (Figura 11 e Tabela 12).

No entanto, o EMS, o qual foi utilizado como controle positivo, aumentou o número de micronúcleos em relação ao grupo controle negativo. Mantendo grupos homogêneos entre os tratamentos e um grupo a parte do controle negativo (EMS). Tabela 13.

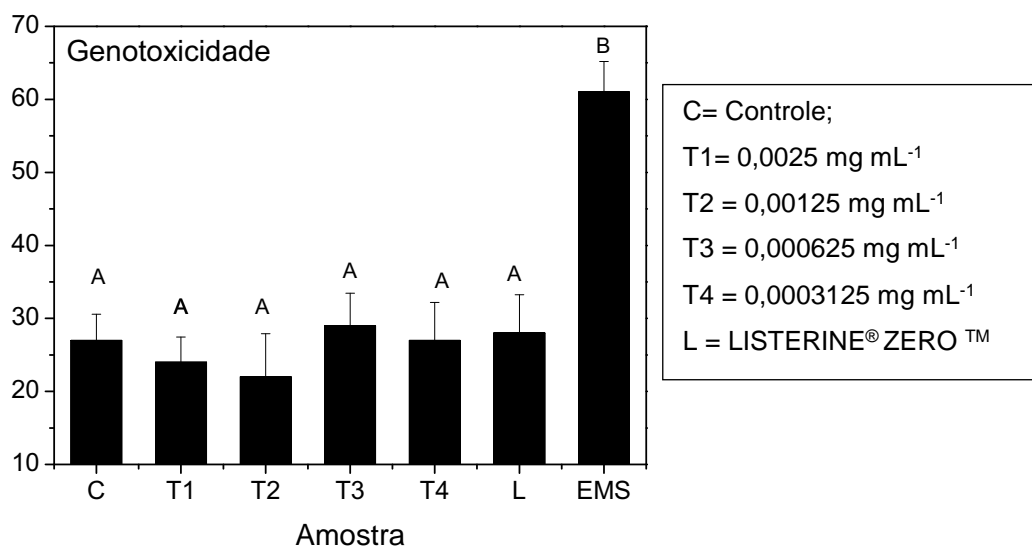


Figura 11 - Gráfico de Genotoxicidade.

Tabela 12-Teste de Dunn (5%) após o teste de Kruskal-Wallis, na comparação do princípio ativo Timol e LISTERINE® ZERO™ com controle (EMS).

($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Kruskal- Wallis (Estatística)	Valor de P Using q2
2,5	13,298	0,405
1,25	12,892	0,283
0,625	11,531	0,808
0.3125	16,136	0,347
LISTERINE® ZERO™	14,298	0,345
EMS	16,136	0,347

Tabela 13 - Valores obtidos no teste comparativo Kruskal – Wallis

Variável	Média e desvio padrão	Grupos Homogêneos	Valor de P
Controle	23,0 ± 3,56	A	
2,5	27,0 ± 5,19	A	0,405
1,25	29,0 ± 4,46	A	0,283
0,625	22,0 ± 5,89	A	0,808
0,3125	24,0 ± 3,45	A	0,347
LISTERINE®ZERO™	28,0 ± 5,23	A	0,345
EMS	61,0 ± 4,18	B	0,00

Alpha 0.05 Valor Z 2.532. Valor para comparação 10.375

6 DISCUSSÃO

Estudos na literatura relatam que o princípio ativo Timol tem ação microbicida.

Rasooli e Owlia (2005), descobriram que os óleos essenciais da espécie *Thymus*, tais como *T. eriocalyx* e *Thymus x-Portlock*, contendo Timol como o componente principal (63,8% e 31,7%), exibiram atividade fungistática (250 ppm) e atividade fungicida (500 ppm) em aflatoxigênicos. Assim como evidenciado em nosso trabalho, com ação microbicida sobre este micro-organismo.

Chan et al. (2013), em seus resultados indicaram claramente que o Timol teve a maior atividade antibacteriana seguido do seu isômero Carvacrol, sendo testadas cepas de *P. aeruginosa* (NCIMB950), *S. aureus* (NCIMB 6571) e *B. subtilis* (NCIMB 3610), enquanto Citronela pode inibir o crescimento de apenas *S. aureus*. Diante destes resultados o Timol foi capaz de matar as cepas de bactérias de forma muito eficaz mesmo com concentrações muito baixas. Por outro lado, o Timol foi mais eficaz do que o conservante natural utilizado popularmente, o Metil-p-hidroxibenzoato (Metilparabeno). Como observado em nosso trabalho, o princípio ativo Timol apresentou resultados significativos quanto à ação antimicrobiana (CIM e CMM e também sobre Biofilme monotípico).

No trabalho de Guarda et al. (2011), a CIM de Carvacrol e Timol apresentaram atividade contra todos os micro-organismos testados, *S. aureus* (ATCC 25923), *L. innocua* (ATCC 33090), *E. coli* O157:H7 non-toxigenic (OPS:EQAS-2003), *S. cerevisiae* (CECT T73) e *Aspergillus niger* var. *niger* (Ep001). Embora Timol e Carvacrol sejam isômeros, observou-se que para o Timol, todas as bactérias e fungos apresentaram uma CMM

de 250 ppm. Enquanto em nosso trabalho a CMM com exposição de 24h para *C. albicans* foi de 0,01 mg mL⁻¹, para *S. aureus* e *S. mutans* foi de 0,16 mg mL⁻¹. Com exposição de 5 min apresentou valores para *C. albicans* e *S. aureus* de 0,08 mg mL⁻¹ e para *S. mutans* com 0,16 mg mL⁻¹.

De acordo com Lebert et al. (2007), Carvacrol e Timol apresentaram níveis moderados e semelhantes de inibição contra cepas das bactérias (*S. equorum*, *S. succinus* e *Lactobacillus sakei*) e em biofilme misto de bactérias patogênicas (*S. aureus*, *Listeria monocytogenes*) e bactérias de deterioração *Pseudomonas fragi*, *Escherichia coli*, mas não teve nenhum efeito detectável para *P. aeruginosa*. A CIM e CMM apresentaram valores semelhantes, exceto com *P. aeruginosa*, em que Carvacrol resultou em CIM de 1,250 mg L⁻¹ e CMM de 2500 mg L⁻¹, enquanto CIM e CMM do Timol foram além da maior concentração utilizada neste estudo (> 2500 mg L⁻¹). Assim Carvacrol e Timol exibiram moderada atividade inibitória contra três cepas de bactérias, mas foram ineficazes contra *P. aeruginosa*. Tepe et al. (2004) também relataram uma atividade significativa de Timol contra *S. aureus in vitro*, no teste de microdiluição em caldo, apresentando uma CIM de 1,12 para Timol e 0,28 para Carvacrol. Em nosso trabalho a CIM para *C. albicans* foi de 0,005 mg mL⁻¹, para *S. aureus* 0,08 mg mL⁻¹ e para *S. mutans* 0,16 mg mL⁻¹.

Também foi observado por Walsh et al. (2003), que o Timol, o principal constituinte do óleo essencial de Tomilho, apresentou efeitos inibidores e biocidas sobre uma série de bactérias, incluindo *E. coli*, *S. aureus*, mas não em *P. aeruginosa*, resultados que se assemelham ao encontrado em nosso trabalho.

Segundo Kavooosi et al. (2013), a atividade antibacteriana das películas de gelatina, contendo Timol em diferentes concentrações foram maiores contra *S. aureus*, *B. subtilis* e *E. coli*, em seguida, por *P. aeruginosa*. Os resultados de contagem de colônias também indicou que o Timol é mais eficaz para bactérias Gram-positivas do que bactérias

Gram-negativas. Em nosso trabalho, o princípio ativo Timol, apresentou redução estatisticamente significativa na concentração de 0,16 mg mL⁻¹ e o LISTERINE® ZERO™ eliminou 100 % das cepas.

Segundo Nostro et al. (2007) a atividade antibacteriana de Timol, Carvacrol e seus derivados foram avaliados contra cepas patogênicas bacterianas *S. aureus* com CIM de 0.031%v/v e CMM 0.062%v/v. A atividade *in vitro* dos óleos em biofilme foi apenas ligeiramente mais baixa do que em cultura planctônica 49.9 ± 3 98.4 ± 9.6 96.9 ± 7.2 para as concentrações de 0,5; 0,25 e 0,125 CIM, respectivamente, sendo que para Timol foram duas ou quatro vezes maior do que a concentração necessária para inibir o crescimento em suspensão. O que difere de nosso trabalho foram as diferentes concentrações utilizadas no teste de biofilme. As doses de 0,5 CIM produziram uma influência maior que doses de 0,25 e 0,125 CIM. Este efeito foi mais evidente para *S. aureus* do que para as cepas de *S. epidermidis*. Na presença de Orégano, Carvacrol e Timol (0,5 CIM), a média para valores de formação de biofilme foram iguais a 46,7; 28,3 e 30,1% de *S. aureus*, 58,9; 57,1 e 54,4% para *S. epidermidis*, respectivamente, evidenciando fatos semelhantes aos encontrados no nosso trabalho.

No trabalho realizado por Soković et al., (2010), foi detectado que Timol e Mentol mostrou alta atividade antibacteriana com a CIM em 0,25-1,0 µg mL⁻¹ e 0,5-3,0 µg mL⁻¹, respectivamente, enquanto o efeito bactericida foi realizado a 0,5-1,5 µg mL⁻¹ para o Timol e 1.0-4.0 µg mL⁻¹ para o Mentol. O Carvacrol também mostrou alta atividade antibacteriana com CIM em 0,02-0,5 µg mL⁻¹ e CMM em 0,125-1,0 µg mL⁻¹. Estes resultados se assemelham ao realizado em nosso trabalho, no entanto a CIM e CMM foram encontradas em concentrações menores. Já os resultados obtidos por Braga PC et al. (2007B), apontam que as linhagens investigadas foram suscetíveis ao Timol com CIM de 125 mg mL⁻¹, sendo que a exposição a um CMM de Timol sozinho induziu uma

grande mudança na morfologia das células, o efeito correspondente de Timol foi apenas $14,00 \pm 4,18\%$, com exposição de 2 h. Após 4 h, o número de células foi reduzido em mais de dez vezes os valores correspondentes das moléculas individuais.

Qiu et al. (2010), em seu estudo apresentou que as concentrações inibitórias mínimas (CIM) de Timol contra 29 estirpes de *S. aureus* foram determinadas e variaram de 64 a 256 mg mL^{-1} . Os valores de CIM de Timol contra *S. aureus* (ATCC 29213) e MRSA cepas 2985 foram de 128 mg mL^{-1} . Estes resultados indicam que o Timol pode ser uma base importante para o desenvolvimento de novas drogas anti-*S. aureus*; o que diferiu de nosso trabalho foram os tempos que o micro-organismo foi exposto: no tratamento com um CIM de 1 x 16 Timol, a taxa de crescimento foi significativamente diminuída; após 30, 180 e 360 min de tratamento com Timol. Ainda em seus trabalhos Qiu et al. (2010), apontaram que o Timol atenua a atividade hemolítica de indução de TNF de sobrenadantes de *S. aureus*. Os autores demonstraram que a secreção de uma hemolisina por *S. aureus*, em resultados de hemólise de eritrócitos de coelho, age como superantígenos, estimulando células T para libertar citocinas pró-inflamatórias como por exemplo, o TNF- α . A partir dos resultados de ensaios de hemolisina, é razoável inferir que a produção de outras toxinas hemolíticas em *S. aureus* pode também ser inibida por concentrações sub-inibitórias de Timol.

Ali-Shtayeh et al. (1997) em seus estudos verificaram a ação antimicrobiana de Carvacrol (isolado a partir de *M. nervosa*) e Timol (cristalina pura, obtida comercialmente). Quando comparados aos antibióticos de referência, ambos os compostos apresentaram atividades significativas contra *C. albicans*, demonstrando ser várias vezes superiores do que a de Nistatina, estando de acordo com resultados apresentados por Kandil et al. (1994) que também observaram que o óleo essencial de *Thymus capitatus* (com 90% de Carvacrol e Timol a 10%) foi

ativo contra *C. albicans*, exibindo um resultado de CMM de 100 mg mL^{-1} , estando de acordo com os resultados encontrados no presente trabalho.

Os valores obtidos por Braga PC et al. (2007A), mostram o valor de CMM para Timol de 125 mg mL^{-1} para *C. albicans*. Também foi avaliado seu efeito sobre a formação de biofilme com cepas ATCC 3153 A. Após 1 e 2 h de incubação, o Timol reduziu significativamente a fase inicial da formação do biofilme e a CMM de Timol só foi significativa após 4 h de incubação. O Timol interferiu com as fases iniciais de formação de biofilme, reduzindo a quantidade de leveduras, bem como a comutação dimórfico a partir de leveduras para formas filamentosas, confirmando resultados anteriores de Braga PC et al. (2007B). No presente trabalho, observou-se resultados significativos em relação ao biofilme, semelhante ao encontrado por Braga PC et al. (2007B), confirmando com estes resultados a capacidade de Timol para penetrar biofilmes de *C. albicans* ativamente. O Timol, um dos principais componentes do óleo de Tomilho, é apontado como sendo capaz de interferir com a adesão de *C. albicans* em células da mucosa humanos, sendo que os resultados obtidos por Braga PC et al. (2007B) e também pelo presente estudo indicam que o Timol pode interferir significativamente não só nas primeiras fases de formação do biofilme, mas também em biofilmes maduros, uma vez que inibe fortemente a atividade metabólica destes.

Agentes antifúngicos clinicamente importantes, tais como a Anfotericina B, Fluconazol, Flucitosina, Itraconazol e Cetoconazol são muito menos ativos contra biofilmes de *C. albicans* do que contra células planctônicas. Tem sido relatado que as concentrações necessárias da droga para reduzir a atividade metabólica em 50% foram 5-8 vezes mais elevadas do que para os biofilmes e para células planctônicas e 30-2000 vezes mais elevado do que os correspondentes CIMs Braga PC et al. (2007A). Já em nosso trabalho, as concentrações para Biofilme monotípico de *C. albicans* ($0,16 \text{ mg mL}^{-1}$) foi superior a concentração

encontrada na CIM e CMM com exposição de 24 h (0,005 e 0,01 mg mL⁻¹, respectivamente).

Braga et al. (2007A), sugeriu que a ação de Timol sobre as células levou a grandes alterações de superfície e modificações morfológicas, reduzindo também a capacidade de adesão de *C. albicans*. Dalleau et al. (2008) mostraram, que os terpenos estudados em seu trabalho (Carvacrol, Geraniol e Timol), foram capazes de forma significativa reduzir o desenvolvimento de biofilme de *C. albicans* ATCC 3153. O que diferiu de nosso trabalho foi que o Timol apresentou resultado menos eficiente contra biofilme de *C. albicans*, sendo observado que a concentração de pelo menos 0,125 mg mL⁻¹ foi necessária para obter uma redução de 75% do biofilme.

Gutiérrez et al. (2010) testaram diferentes estirpes de cepas, incluindo *C. albicans* ATCC 10231, apresentando CIM de 128 mg mL⁻¹, demonstrando que Timol possui atividade antifúngica *in vitro* contra *C. albicans*, como observado em nosso trabalho.

De acordo com Gutierrez et al. (2010), que testaram os principais componentes do óleo essencial de orégano (EO), Carvacrol e Timol, foram relatados que os efeitos anti-bacterianos têm sido atribuídos a sua capacidade para permeabilizar e despolarizar a membrana citoplasmática, sendo que algumas leveduras tal como *C. albicans* foram mais sensíveis à conservantes naturais do que as bactérias. Este resultado foi semelhante ao obtido em nosso estudo, demonstrando atividade antifúngica e bactericida.

Em nosso estudo realizamos também os mesmos testes com LISTERINE® ZERO™, o qual apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans*, como no trabalho realizado por Antunes et al., 2014.

De acordo com Botelho et al. (2007), a atividade antibacteriana do LSEO e os compostos fenólicos (Timol e Carvacrol) foi inicialmente avaliada pelo método disco difusão por meio de quatro cepas de bactérias cariogênicas (*S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius* e *S. mitis*)

e uma cepa de levedura (*C. albicans*). Os três compostos testados exibiram alta atividade antibacteriana e relativamente baixa anti-fúngica, o que difere de nossos resultados.

Os componentes Timol e Carvacrol foram mais ativos, com valores de CIM variando de 2,5 a 5,0 mg mL⁻¹, em comparação para LSEO (CIM = 5 -10 mg mL⁻¹), mostrando um efeito significativo contra bactérias cariogênicas. Embora as CIMs e CMMs variaram entre organismos do teste, na maioria dos casos, a CIM estava perto do CMM, indicando boa ação antibacteriana dos compostos monoterpênicos, assim como demonstrado em nosso estudo. Os dados de Botelho et al. (2007) mostram que o óleo essencial testado e seus principais compostos fenólicos (Timol e Carvacrol) mostrou atividade antimicrobiana contra o principal grupo de bactérias cariogênicas e de *C. albicans* bem como no nosso estudo. Dentre os micro-organismos ligados a cárie dentária, *S. mutans* apresentou a maior sensibilidade aos compostos testados, diferindo de nossos resultados, onde *S. mutans* apresentou a menor sensibilidade ao Timol.

Concentrações diluídas de LISTERINE® foram ineficazes na inibição do biofilme de *S. mutans* ou *L. plantarum* mais do que 50%, embora a inibição do crescimento contra as culturas planctônicas foi de 70% contra *L. plantarum* e 80% contra *S. mutans*. (Filoche et al., 2005). Em nosso trabalho foi utilizado o LISTERINE® ZERO™ puro, diferindo então a concentração do mesmo. Neste estudo realizado por Filoche et al., (2005) mostrou que os óleos essenciais como o Timol exibiram efeitos inibidores de crescimento contra duas importantes bactérias cariogênicas *S. mutans* e *L. plantarum*. Eles inibiram a formação do biofilme durante o crescimento planctônico e também inibiu o crescimento de biofilmes.

Como visto por Smith et al. (2003B), o LISTERINE® foi eficaz contra o micro-organismo *S. mutans*, como evidenciado em nosso trabalho .

No estudo, realizado por Liang et al. (2014) a citotoxicidade potencial de Timol foi avaliada através do ensaio de MTT. Após incubar as células epiteliais mamárias de ratos (mMECs) durante 24 h na ausência ou na presença de LPS, o resultado mostrou que a viabilidade celular não foi afetada por Timol, nas concentrações usadas (10, 20, e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Já em nosso trabalho as concentrações 10, 20 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram consideradas citotóxicas na exposição por 24 h ao princípio ativo Timol, sendo que somente a partir da concentração de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pode-se verificar que não foram citotóxicas.

Ocaña-Fuentes et al. (2010), testaram várias concentrações de Timol durante 24 e 48 h de incubação, com duas frações (S1 e S2 do extrato de Orégano). Verificaram que não houve diminuição significativa na viabilidade celular para concentrações até 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, no entanto, para concentrações superior a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato de orégano nas frações S1 e S2 ocorreu uma redução na viabilidade celular de uma forma dependente da dose. Estes resultados sugerem que as concentrações acima de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ são tóxicas, o que se assemelha em partes com nosso trabalho, pois encontramos que a concentração de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi considerada não citotóxica.

Hsu et al. (2011), em seu trabalho evidenciou que Timol induz e aumenta a morte celular em células de Glioblastoma humano (Hep-2). Também mostram que o Timol é citotóxico para estas células de uma maneira dependente da concentração, como evidenciado em nosso trabalho, sendo que o Timol também foi considerado citotóxico nas concentrações mais elevadas utilizadas.

Deb et al. (2011), avaliaram o efeito inibidor do Timol contra células HL-60. O Timol mostrou redução na viabilidade celular a partir de doses de 25 μL sobre HL-60 e acima de 50 μL , exibiu grande citotoxicidade contra as células controle após 24 h de exposição. O Timol nas doses de 5 e 25 μL não apresentou citotoxicidade significativa em 12 h de exposição. Assim como em nosso trabalho, após a exposição de 24h

ao Timol, apresentou redução na viabilidade celular, diferindo apenas na dose dependente, o que pode ser compreensível devido à diferença no tipo celular testado. Os autores acreditam que o efeito inibitório do Timol sobre o crescimento celular foi dose-dependente do ciclo celular, o que indica a sua potencialidade em inibir a progressão do ciclo celular com o aprisionamento das células na fase G0-G1. Ainda relataram o potencial apoptótico do Timol sobre as células HL-60 em que o Timol inibiu o crescimento celular e induziu a apoptose, sugerindo efeito inibidor do crescimento e proliferação celular, que é altamente relacionada com a ativação de uma variedade de vias de sinalização intracelular.

De acordo com Llana-Ruiz-Cabello et al. (2014), os poucos dados de toxicidade *in vivo* disponíveis na literatura dizem respeito sobretudo aos efeitos agudo e subagudo sobre diferentes espécies de animais, e sugerem que esses compostos podem não representar um risco para a saúde humana. Vários modelos *in vitro* têm sido utilizados para avaliar a toxicidade destes óleos essenciais e seus constituintes. Neste sentido, o tempo e efeitos citotóxicos dose-dependentes e alterações morfológicas em uma linhagem de células de músculo esquelético (CO25) exposto ao Carvacrol e ao Timol foram relatados. Llana-Ruiz-Cabello et al. (2014), verificaram que o Timol, não produziu necrose ou apoptose sobre as células em qualquer das concentrações utilizadas (62,5; 75; 125 ou 250 mL), em comparação ao grupo controle. Após 24 e 48 h, as células expostas à concentração de 75 mL do Timol, apresentaram um maior grau de diferenciação do que as células não expostas. A apoptose bem como a necrose foram observadas após 24 h de exposição ao Carvacrol e sua mistura com o Timol, mas não causou dano celular significativo, o qual foi observada em exposição Timol (Llana-Ruiz-Cabello et al., 2014), assim como evidenciado em nosso trabalho.

No trabalho realizado por Liang et al. (2014), verificou-se o efeito do potencial anti-inflamatório de Timol, em resposta inflamatória

estimulada por LPS em células epiteliais mamárias de ratos (mMECs). A resposta inflamatória induzida por LPS é caracterizada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β , e IL-6 (Rainard, Riollot, 2006; Lahouassa et al., 2007). Estas citocinas desempenham papéis cruciais durante a inflamação. Em nosso trabalho o Timol apresentou valores baixos na produção de TNF- α .

TNF- α , juntamente com IL-1 β e IL-6, é reconhecido como um importante mediador inflamatório, e a sobre-expressão destas citocinas pode conduzir a reações pró-inflamatórias graves. Os níveis de TNF- α e IL-6 aumentaram significativamente após desafio do LPS em comparação com aqueles do grupo controle, enquanto que o pré-tratamento com Timol (20 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) reduziu a produção de TNF- α e IL-6 de um modo dose-dependente, e o níveis de citocinas foram menor do que os do grupo de LPS. Os resultados mostraram que o Timol, na resposta inflamatória é capaz de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias em culturas primárias (mMEC) estimulada por LPS, assim como evidenciado em nosso trabalho.

A atividade anti-inflamatória do Timol pode ser demonstrada pelo efeito sobre as proteínas iNOS e COX-2 na expressão induzida por LPS em células epiteliais primárias de ratos (mMECs). A análise de Western blot mostraram que a expressão de iNOS e COX-2 foram fortemente aumentadas por LPS, enquanto que a aplicação de Timol (10, 20, e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 1 h antes do tratamento com LPS resultou numa grande redução dos níveis de iNOS e COX-2 de uma forma dose-dependente em mMECs. Estes resultados demonstraram que o Timol exerce efeitos benéficos nestas células induzidas por LPS, que foi associada com a atenuação de respostas inflamatórias. (Strandberg et al., 2005). Estas citocinas pró-inflamatórias são exemplos típicos de mediadores multifuncionais envolvidos na regulação da resposta imune e inflamação.

TNF- α e IL-1 β são os principais componentes da resposta imune inata para infecção (Lahouassa et al., 2007). De acordo com Liang et al. (2014), as concentrações de TNF- α foram marcadamente aumentadas em cultura celular após 12 h da estimulação do LPS, e o pré-tratamento com o Timol inibiu a produção de TNF- α numa maneira dose-dependente. Miao et al. (2012), seus resultados indicaram que o Timol atenuou a liberação da citocina pró-inflamatória TNF- α e exerceu efeitos positivos contra as células mMECs com indução de LPS. Os resultados de Liang et al. (2014), sugerem que o Timol poderia promover um efeito anti-inflamatório contra a indução de LPS. Como evidenciado em nosso trabalho, o Timol não induziu a produção de citocinas nas concentrações testadas.

Ocaña-Fuentes et al. (2010), evidenciou que os macrófagos mostraram um aumento na liberação de todas as citocinas pró e anti-inflamatórias analisadas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, e IL-10, respectivamente) em comparação com os controles não-ativados. O tratamento de células ativadas com o extrato de Orégano (contendo Timol) resultou em uma redução de citocinas pro-inflamatórias. Células incubadas por 24 h com extrato de Orégano em duas concentrações testadas, mostraram uma diminuição nos níveis de liberação de TNF- α em uma dose-dependente, atingindo os níveis basais de TNF- α , quando incubadas com 30 g mL⁻¹ do extrato. Isso demonstrou o efeito significativo do Timol sobre as células causando a diminuição da liberação de TNF- α , como evidenciado em nosso trabalho, e além de aumentar a secreção de citocinas anti-inflamatórias em macrófagos ativados.

Óleos essenciais, contendo o Timol como princípio ativo têm sido usados em macrófagos, causando efeito anti-inflamatório através da diminuição de TNF- α , IL-6 e secreção de IL-1 β (Chao et al., 2005), como evidenciado em nosso trabalho.

Chauhan et al. (2014), demonstraram que os níveis de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL-1 β , foram diminuídos após o

tratamento com Timol em três concentrações (50, 100 e 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$), sendo que a maior concentração foi capaz de causar uma maior diminuição. Assim, determinou-se o potencial do Timol sobre a liberação destas citocinas e observou-se uma significativa diminuição do nível delas, assim como observado em nosso trabalho, sendo esta redução dose-dependente.

A avaliação do potencial genotóxico destes compostos é um passo crítico devido à relevância para a segurança humana, em relação à indução do potencial de carcinogênese e defeitos hereditários. Vários modelos *in vitro* têm sido utilizados para avaliar a genotoxicidade de compostos como Carvacrol e Timol (Deb et al., 2011), embora o mecanismo tóxico destes compostos não foi completamente elucidado, em nosso trabalho foi demonstrado que o Timol não apresenta potencial genotóxico.

Llana-Ruiz-Cabello et al. (2014), demonstraram uma diminuição da sua concentração e tempo-dependente na viabilidade de células intestinais humanas (Caco-2). Não foram observados efeitos citotóxicos de Timol em qualquer concentração e tempo de exposição. Poucos estudos têm sido realizados investigando sobre a mutagenicidade ou antimutagenicidade destas substâncias e seu potencial genotóxico e os resultados são contraditórios, vários estudos demonstraram forte atividade antimutagenica e antitumorogênica de Carvacrol usando vários ensaios (Ipek et al, 2003; Zeytinoglu et al., 2003).

O potencial genotóxico de Carvacrol e Timol em doses não-tóxicas pode ser fraco (Stammati et al., 1999), no entanto, a possível ação destes compostos no nível do DNA não pode ser excluído porque foram capazes de induzir uma fragmentação nuclear (De Vicenzi et al., 2004). A falta de atividade clastogênica de Timol e Carvacrol em concentrações biologicamente relevantes foi relatado em células de fibroblasto de pulmão de hamster chinês (V79), não apresentando danos

ao DNA (Ündeger et al., 2009), assim como evidenciado em nosso trabalho, as doses testadas não causaram dano a nível do DNA.

Llana-Ruiz-Cabello et al. (2014), demonstrou que após a exposição ao Timol, não houve um aumento no número de revertentes e nenhuma indicação de atividade mutagênica em qualquer das estirpes tratados até a concentração mais elevada. Isto demonstra que Timol não é mutagênico no ensaio bacteriano nas concentrações testadas. O potencial dos efeitos nocivos do Carvacrol (0-460 mL) e Timol (0-250 mL) sobre o DNA foram pequenos, pois estes não induziram danos ao DNA de células Caco-2 em qualquer concentração testada após 24 ou 48 h de exposição. Desta forma, Llana-Ruiz-Cabello et al. (2014) concluíram que o potencial mutagênico de Timol e Carvacrol é muito fraco. Verificaram que Carvacrol foi um pouco mais genotóxico do que o Timol, para as células expostas na maior concentração de Carvacrol (460 mL) por 48 h. No entanto, o Timol não mostrou efeitos mutagênico ou genotóxico, em qualquer concentração testada. Assim, para as células Caco-2 expostas ao Timol, não houve danos significativos no DNA, assim como em nosso trabalho em que os tratamentos realizados com Timol e LISTERINE® ZERO™ não foram capazes de aumentar o número de micronúcleos significativamente em relação ao grupo controle negativo.

O Timol puro não causa qualquer dano ao DNA, indicando seu efeito não genotóxico (Shettigar et al., 2014).

Vários estudos têm mostrado que o Timol apresenta efeitos quimiopreventivo e radioprotetor contra a toxicidade e genotoxicidade induzida por substâncias químicas e agentes ionizantes. O Timol exibiu um efeito protetor contra o estresse oxidativo induzido por radiação e peroxidação lipídica. Este efeito protetor é devido sua atividade antioxidante (Hosseinimehr et al., 2011). Archana et al. (2011), evidenciou que Timol mostrou proteção contra danos ao DNA por radiação induzida, após várias doses de tratamento com Timol em células V79, desta forma o Timol, não foi tóxico para DNA, como evidenciado em nosso trabalho.

Vicuña et al. (2010), mostraram propriedades antigenotóxicas do Timol contra mutagênicos conhecidos. Desta forma, o Timol aumentou significativamente a atividade das enzimas antioxidantes tais como Superóxido dismutase e Glutathione peroxidase em ratos. A atividade antigenotóxica relacionada com os principais constituintes do óleo essencial de *L. origanoides*, o Carvacrol e o Timol, fornece evidências sobre o potencial quimiopreventivo destes constituintes, em nosso trabalho, o Timol não apresentou qualquer dano ao DNA.

Diante do exposto, temos que o princípio ativo Timol dependendo da sua concentração apresentou uma atividade antimicrobiana para *Candida albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* e não foi citotóxico e nem genotóxico para macrófagos. O enxaguatório bucal LISTERINE® ZERO™ foi tóxico para macrófagos e apresentou atividade antimicrobiana para os mesmos micro-organismos testados com Timol.

O número de estudos sobre os efeitos mutagênicos e genotóxicos destes compostos permanece limitada, mais estudos são necessários para confirmar estes achados e elucidar o papel do estresse oxidativo na produção de danos ao DNA (Llana-Ruiz-Cabello et al., 2014).

Sugerimos que mais testes sejam realizados utilizando o princípio ativo e o LISTERINE® ZERO™, em relação à toxicidade e genotoxicidade, pois são poucos dados encontrados na literatura neste sentido.

7 CONCLUSÃO

Neste estudo podemos concluir:

- Ação Antimicrobiana:

Para *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* as diluições do princípio ativo Timol necessárias para atingir a concentração microbicida foram diferentes. E para Formação de Biofilme monotípico, a diluição testada do princípio ativo Timol, apresentou redução significativa para os três micro-organismos testados. O enxaguatório bucal LISTERINE® ZERO™ foi capaz de eliminar 100% das cepas de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* (Formação de Biofilme monotípico) e apresentou CMM na menor diluição testada.

- Cultura Celular:

A concentração que foi eficaz contra *C. albicans* não foi considerada tóxica para a cultura celular de macrófagos (RAW 264.7) No teste de MTT e não causou dano ao DNA pelo teste de micronúcleos. Já a concentração que foi eficaz contra *S. aureus* e *S. mutans* foi considerada tóxica para a cultura celular de macrófagos, mas também não causou dano ao DNA. Ainda o Timol foi capaz de diminuir a liberação de TNF- α , demonstrando baixo potencial inflamatório/citotóxico.

O enxaguatório bucal LISTERINE® ZERO™ apresentou citotoxicidade para macrófagos pelo teste MTT, mas não causou dano ao DNA celular pelo teste de micronúcleos, e apresentou os maiores valores

de produção de TNF- α , com diferença significativa em relação aos demais grupos.

8 REFERÊNCIAS*

Ahmad A, Khan A, Manzoor N. Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. *Eur J Pharm Sci.* 2013;48(1-2):80-6.

Al-Bandak G, Dermesonlougrou EF, Taoukis SP, Oreopoulou V. Antioxidant effect of *Majorana syriaca* extract in bulk corn oil and o/w emulsion after applying high hydrostatic pressure. *Food Chem.* 2011;125(4):1166-70.

Ali-Shtayeh MS, Al-Nuri MA, Yaghmour RM, Faidi YR. Antimicrobial activity of *Micromeria nervosa* from the Palestinian area. *J Ethnopharmacol.* 1997;58(3):143-7

Antunes DP, Salvia AC, de Araújo RM, Di Nicoló R, Koga Ito CY, de Araujo MA. Effect of green tea extract and mouthwash without alcohol on *Candida albicans* biofilm on acrylic resin. *Gerodontology.* 2014;21.

Archana PR, Nageshwar Rao B, Satish Rao BS. Modulation of gamma ray-induced genotoxic effect by thymol, a monoterpene phenol derivative of cymene. *Integr Cancer Ther.* 2011;10(4):374-83.

Baillie GS, Douglas LJ. *Candida* biofilms and their susceptibility to antifungal agents. *Methods Enzymol.* 1999;310:644-56.

Barbieri DSV, Vicente VA, Fraiz FC, Lavoranti OJ, Svidzinski TIE, Pinheiro RL. Analysis of the *in vitro* adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Braz J Microbiol.* 2007;38:624-31.

Braga LC, Shupp JW, Cummings C, Jett M, Takahashi JA, Carmo LS, et al. Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *J Ethnopharmacol.* 2005;96(1-2):355-9.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Braga PC, Alfieri M, Culici M, Dal Sasso M. Inhibitory activity of thymol against the formation and viability of *Candida albicans* hyphae. *Mycoses*. 2007a;50(6):502-6.

Braga PC, Sasso MD, Culici M, Alfieri M. Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. *Fitoterapia*. 2007b;78(6):396-400.

Bostancıoğlu RB, Kürkçüoğlu M, Başer KH, Koparal AT. Assessment of anti-angiogenic and anti-tumoral potentials of *Origanum onites* L. essential oil. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(6):2002-8

Botelho MA, Nogueira NA, Bastos GM, Fonseca SG, Lemos TL, Matos FJ. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Braz J Med Biol Res*. 2007;40(3):349-56.

Casey AL, Lambert PA, Elliott TS. *Staphylococci*. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;29 Suppl23-32.

Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(9):629-41.

Chan AC, Ager D, Thompson IP. Resolving the mechanism of bacterial inhibition by plant secondary metabolites employing a combination of whole-cell biosensors. *J Microbiol Methods*. 2013;93(3):209-17.

Chao LK, Hua KF, Hsu HY, Cheng SS, Liu JY, Chang ST. Study on the antiinflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. *J Agric Food Chem*. 2005;53(18):7274-8

Chauhan AK, Jakhar R, Paul S, Kang SC. Potentiation of macrophage activity by thymol through augmenting phagocytosis. *Int Immunopharmacol*. 2014;18(2):340-6.

Cowen LE, Steinbach WJ. Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryot Cell*. 2008;7(5):747-64.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):13-22.

Dalleau S, Cateau E, Bergès T, Berjeaud JM, Imbert C. *In vitro* activity of terpenes against *Candida* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;31(6):572-6.

Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2(2):114-22.

Deb DD, Parimala G, Saravana Devi S, Chakraborty T. Effect of thymol on peripheral blood mononuclear cell PBMC and acute promyelotic cancer cell line HL-60. *Chem Biol Interact.* 2011;193(1):97-106.

De Vincenzi M, Stamatii A, De Vincenzi A, Silano M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia.* 2004;75(7-8):801-4.

DiTizio V, Ferguson GW, Mittelman MW, Khoury AE, Bruce AW, DiCosmo F. A liposomal hydrogel for the prevention of bacterial adhesion to catheters. *Biomaterials.* 1998;19(20):1877-84.

Domaracký M, Reháč P, Juhás S, Koppel J. Effects of selected plant essential oils on the growth and development of mouse preimplantation embryos *in vivo*. *Physiol Res.* 2007;56(1):97-104.

Duarte S, Gregoire S, Singh AP, Vorsa N, Schaich K, Bowen WH, et al. Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;257(1):50-6.

Emiroğlu ZK, Yemiş GP, Coşkun BK, Candoğan K. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Sci.* 2010;86(2):283-8.

Faria NC, Kim JH, Gonçalves LA, Martins Mde L, Chan KL, Campbell BC. Enhanced activity of antifungal drugs using natural phenolics against yeast strains of *Candida* and *Cryptococcus*. *Lett Appl Microbiol.* 2011;52(5):506-13.

Filoche SK, Soma K, Sissons CH. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiol Immunol.* 2005;20(4):221-5.

Franz R, Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Ruhnke M, Morschhäuser J. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(12):3065–72.

Fukai T, Marumo A, Kaitou K, Kanda T, Terada S, Nomura T. Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia.* 2002;73(6):536-9.

Gilbert GA, Wilson C, Madore MA. Root-zone salinity alters raffinose. Oligosaccharide Metabolism and Transport in Coleus. *Plant Physiol.* 1997;115(3):1267-76.

Guarda A, Rubilar JF, Miltz J, Galotto MJ. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *Int J Food Microbiol.* 2011 Mar 30;146(2):144-50.

Gutiérrez L, Batlle R, Sánchez C, Nerín C. New approach to study the mechanism of antimicrobial protection of an active packaging. *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7(9):1063-9.

Haidari M, Ali M, Ward Casscells S 3rd, Madjid M. Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. *Phytomedicine.* 2009;16(12):1127-36.

Hameed S, Fatima Z. Novel regulatory mechanisms of pathogenicity and virulence to combat MDR in *Candida albicans*. *Int J Microbiol.* 2013;2013:240209.

Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug: possible modes of action. *J Nat Prod.* 1996;59(2):205-15.

Haukali G, Poulsen S. Effect of a varnish containing chlorhexidine and thymol (Cervitec) on approximal caries in 13- to 16-year-old schoolchildren in a low caries area. *Caries Res.* 2003;37(3):185-9.

Holetz FB, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Mello JC, Morgado-Díaz JA, Toledo CE, et al. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpeessoai*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100(4):397-401.

Hosseinimehr SJ, Mahmoudzadeh A, Ahmadi A, Ashrafi SA, Shafaghatai N, Hedayati N. The radioprotective effect of *Zataria multiflora* against genotoxicity induced by γ irradiation in human blood lymphocytes. *Cancer Biother Radiopharm.* 2011;26(3):325-9.

Hsu SS, Lin KL, Chou CT, Chiang AJ, Liang WZ, Chang HT. Effect of thymol on Ca²⁺ homeostasis and viability in human glioblastoma cells. *Eur J Pharmacol.* 2011;670(1):85-91.

Hube B. From comensal to pathogen: stage-and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol.* 2004;7(4):336-41.

Ipek E, Tüylü BA, Zeytinoğlu H. Effects of carvacrol on sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *Cytotechnology.* 2003;43(1-3):145-8.

Ishida K, Rozenenthal S, de Mello JC, Nakamura CV. Activity of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on *Cryptococcus neoformans*: effects on

growth, capsule size and pigmentation. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2009;8:29.

Kandil O, Radwan NM, Hassan AB, Amer AM, el-Banna HA, Amer WM. Extracts and fractions of *Thymus capitatus* exhibit antimicrobial activities. *J Ethnopharmacol.* 1994;44(1):19-24.

Kavoosi G, Dadfar SM, Purfard AM. Mechanical, physical, antioxidant, and antimicrobial properties of gelatin films incorporated with thymol for potential use as nano wound dressing. *J Food Sci.* 2013;78(2):E244-50.

Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(2):255-67.

Lahouassa H, Moussay E, Rainard P, Riollet C. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Cytokine.* 2007;38(1):12-21.

Llana-Ruiz-Cabello M, Gutiérrez-Praena D, Pichardo S, Moreno FJ, Bermúdez JM, Aucejo S. Cytotoxicity and morphological effects induced by carvacrol and thymol on the human cell line Caco-2. *Food Chem Toxicol.* 2014;64:281-90.

Lebert I, Leroy S, Talon R. Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. *Food Microbiol.* 2007;24(3):281-7.

Liang D, Li F, Fu Y, Cao Y, Song X, Wang T. Thymol inhibits LPS-stimulated inflammatory response via down-regulation of NF- κ B and MAPK signaling pathways in mouse mammary epithelial cells. *Inflammation.* 2014;37(1):214-22.

Lo HJ, Kohler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell.* 1997;90(5):939-49.

Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.* 1998;339(8):520-32.

MacCallum DM. *Candida* infections and modelling disease. In: Ashbee R, Bignell EM, editors. *Pathogenic yeasts.* Berlin:Springer. 2010. p.41–67.

Machado TB, Pinto AV, Pinto MC, Leal IC, Silva MG, Amaral AC, et al. *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents.* 2003;21(3):279-84.

Magyar J, Szentandrassy N, Banyasza T, Fulop L, Varro A, Nanasi PP. Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes. *Eur Pharmacol.* 2004;487(1):29-36.

Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes. *Microbiology.* 2003;149(Pt 2):279-94.

Meléndez PA, Capriles VA. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. *Phytomedicine.* 2006;13(4):272-6.

Miao J, Fa Y, Gu B, Zhu W, Zou S. *Taurine attenuates* lipopolysaccharide-induced disfunction in mouse mammary epithelial cells. *Cytokine.* 2012;59(1):35-40.

Moore TC, Smith DE, Kenny GE. Sanitization of dentures by several denture hygiene methods. *Prosthet Dent.* 1984;52(2):158-63.

Naglik JR, Moyes D, Makwana J, Kanzaria P, Tsihlaki E, Weindl G, et al. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology.* 2008;154(Pt 11):3266-80.

Navarro V, Villarreal ML, Rojas G, Lozoya X. Antimicrobial evaluation of some plants used in mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *J Ethnopharmacol.* 1996;53(3):143-7.

NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard. 6th ed. NCCLS document M7-A6 ISBN 1-56238-486-4. USA: NCCLS;2003.

NCCLS. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras; Norma Aprovada. 2. ed. NCCLS document M27-A2. ISBN 1-56238-469-4. USA: NCCLS; 2002.

Nostro A, Sudano Roccaro A, Bisignano G, Marino A, Cannatelli MA, Pizzimenti FC. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Med Microbiol.* 2007;56(Pt 4):519-23.

Ocaña-Fuentes A, Arranz-Gutiérrez E, Señorans FJ, Reglero G. Supercritical fluid extraction of oregano (*Origanum vulgare*) essentials oils: anti-inflammatory properties based on cytokine response on THP-1 macrophages. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(6):1568-75.

Ogaard B, Larsson E, Glans R, Henriksson T, Birkhed D. Antimicrobial effect of a chlorhexidine-thymol varnish (Cervitec) in orthodontic patients. A prospective, randomized clinical trial. *J Orofac Orthop.* 1997;58(4):206-13.

Oliveira JR, Castro VC, das Graças Figueiredo Vilela P, Camargo SE, Carvalho CA, Jorge AO, et al. Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13:208.

Onawunmi GO, Yisak WA, Ogunlana EO. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. *J Ethnopharmacol.* 1984;12(3): 279-86.

Ooshima T, Osaka Y, Sasaki H, Osawa K, Yasuda H, Matsumura M. Caries inhibitory activity of cacao bean husk extract in *in vitro* and animals experiments. *Arch Oral Biol.* 2000;45(8):639-45.

Pauli A. Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils. *Med Res Rev.* 2006;26(2):223-68.

Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 2003;57:677-701.

Pattnaik S, Subramanyam VR, Bapaji M, Kole CR. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios.* 1997;89(358):39-46.

Pellati D, Fiore C, Armanini D, Rassu M, Bertoloni G. *In vitro* effects of glycyrrhetic acid on the growth of clinical isolates of *Candida albicans*. *Phytother Res.* 2009;23(4):572-4.

Pereira CA, Toledo BC, Santos CT, Costa AC, Back-Brito GN, Kaminagakura E. Opportunistic microorganisms in individuals with lesions of denture stomatitis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013a;76(4):419-24.

Pereira CA, Costa AC, Carreira CM, Junqueira JC, Jorge AO. Photodynamic inactivation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* biofilms *in vitro*. *Lasers Med Sci.* 2013b; 28(3):859-64.

Pereira CA, Romeiro RL, Costa AC, Machado AK, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an *in vitro* study. *Lasers Med Sci.* 2011;26(3)341-8.

Pereira JV, Pereira MSV, Sampaio FC, Sampaio MCC, Alves PM, Araújo CRF, et al. Efeito antibacteriano e antiaderente *in vitro* do extrato de *Punica granatum* L. sobre microrganismos do biofilme dental. Rev. Bras Farmacognosia. 2006;16(1):88-93.

Pina-Vaz C, Gonçalves Rodrigues A, Pinto E, Costa-de-Oliveira S, Tavares C, Salgueiro L et al. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2004;18(1):73-8.

Qiu J, Wang D, Xiang H, Feng H, Jiang Y, Xia L. Subinhibitory concentrations of thymol reduce enterotoxins A and B and alpha-hemolysin production in *Staphylococcus aureus* isolates. PLoS One. 2010;5(3):e9736.

Radulovic N, Stojanovic G, Palic R. Composition and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. essential oil. Phytother Res. 2006;20(1):85–8.

Rainard P, Riollot C. Innate immunity of the bovine mammary gland. Vet Res. 2006;37(3):369-400

Rasooli I, Owlia P. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. Phytochemistry. 2005;66(24):2851-6.

Reuveni R, Fleischer A, Putievsk E. Fungistatic activity of essential oils from *Ocimum basilicum* chemotypes. Phytopath Z.1984;110(1):20-2.

Richard ML, Nobile CJ, Bruno VM, Mitchell AP. *Candida albicans* biofilm-defective mutants. Eukaryot Cell. 2005;4(8):1493-502.

Ruping MJ, Vehreschild JJ, Cornely AO. Patients at high risk of invasive fungal infections: when and how to treat. Drugs 2008;68 (14):1941–62.

Ryan LK, Freeman KB, Masso-Silva JA, Falkovsky K, Aloyouny A, Markowitz K et al. Activity of potent and selective host defense peptide mimetics in mouse models of oral candidiasis. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(7):3820-7.

Sánchez ME, Turina AV, García DA, Nolan MV, Perillo MA. Surface activity of thymol: implications for an eventual pharmacological activity. Colloids Surf B Biointerfaces. 2004;34(2):77-86.

Santos VR, Gomes RT, Oliveira RR, Cortés ME, Brandão MGL. Susceptibility of oral pathogenic microorganisms to aqueous and ethanolic

extracts of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão). *Int J Dent*. 2009;8(1):1-5.

Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL. Engineered control of cell morphology *in vivo* reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell* 2003;2(5):1053-60.

Scull CM, Hays WD, Fischer TH. Macrophage pro-inflammatory cytokine secretion is enhanced following interaction with autologous platelets. *J Inflamm (Lond)*. 2010;11;7:53

Segvić Klarić M, Kosalec I, Mastelić J, Piecková E, Pepeljnak S. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Lett Appl Microbiol*. 2007;44(1):36-42.

Shettigar NB, Das S, Rao NB, Rao SB. Thymol, a monoterpene phenolic derivative of cymene, abrogates mercury-induced oxidative stress resultant cytotoxicity and genotoxicity in hepatocarcinoma cells. *Environ Toxicol*. 2014 .

Shen S, Samaranayake LP, Yip HK. *In vitro* growth, acidogenicity and cariogenicity of predominant human root caries flora. *J Dent*. 2004;32(8):667-78.

Sikkema J, de Bont JA, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev*. 1995;59(2):201-22.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(2):288-305.

Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett Appl Microbiol*. 1998;26(2):118–22.

Smith AJ, Morrison D, Robertson D, Tang MK, Al Doori Z. Efficacy of oral hygiene products against MRSA and MSSA isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2003a;52(4):738-9.

Smith AJ, Robertson D, Tang MK, Jackson MS, MacKenzie D, Bagg J. *Staphylococcus aureus* in the oral cavity: a three-year retrospective analysis of clinical laboratory data. *Br Dent J*. 2003b;195(12):701–3.

Smith AJ, Jackson MS, Bagg J. The ecology of *Staphylococcus species* in the oral cavity. *J Med Microbiol*. 2001;50(11):940-6.

Soković M, Glamočlija J, Marin PD, Brkić D, van Griensven LJ. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. *Molecules*. 2010;15(11):7532-46.

Sköld K, Twetman S, Hallgren A, Yucel-Lindberg T, Modéer T. Effect of a chlorhexidine/thymol-containing varnish on prostaglandin E2 levels in gingival crevicular fluid. *Eur J Oral Sci*. 1998 Feb;106(1):571-5.

Solórzano-Santos F, Miranda-Novales MG. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol*. 2012;23(2):136-41

Stammati A, Bonsi P, Zucco F, Moezelaar R, Alakomi HL, von Wright A. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. *Food Chem Toxicol*. 1999;37(8):813-23.

Stewart PS. Diffusion in biofilms. *J Bacteriol*. 2003;185(5):14-91.

Strandberg Y, Gray C, Vuocolo T, Donaldson L, Broadway M, Tellam R. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. *Cytokine*. 2005;31(1):72-86.

Tepe B, Daferera D, Sokmen M, Polissiou M, Sokmen A. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigi* M. Zohary et P.H. Davis. *J Agric Food Chem*. 2004;52(5):1132-7.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol*. 2006;51(8):672-80.

Twetman S, Hallgren A, Petersson LG. Effect of an antibacterial varnish on mutans streptococci in plaque from enamel adjacent to orthodontic appliances. *Caries Res*. 1995;29(3):188-91.

Undeğer U, Başaran A, Degen GH, Başaran N. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food Chem Toxicol*. 2009 Aug;47(8):2037-43

van der Hoeven JS, Camp PJ. Mixed continuous cultures of *Streptococcus mutans* with *Streptococcus sanguis* or with *Streptococcus oralis* as a

model to study the ecological effects of the lactoperoxidase system. *Caries Res.* 1993;27(1):26-30.

Vasconcelos LC, Sampaio FC, Sampaio MC, Pereira Mdo S, Higino JS, Peixoto MH. Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. *Braz Dent J.* 2006;17(3):223-7.

Vlachojannis C, Winsauer H, Chrubasik S. Effectiveness and safety of a mouthwash containing essential oil ingredients. *Phytother Res.* 2013;27(5):685-91.

Vicuña GC, Stashenko EE, Fuentes JL. Chemical composition of the *Lippia organoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitoterapia.* 2010;81(5):343-9.

Walsh SE, Maillard JY, Russell AD, Catrenich CE, Charbonneau DL, Bartolo RG. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *J Appl Microbiol.* 2003;94(2):240-7.

White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(2):382–402.

Wittschier N, Faller G, Hensel A. Aqueous extracts and polysaccharides from liquorice roots (*Glycyrrhiza glabra* L.) inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. *J Ethnopharmacol.* 2009;125(2):218-23.

Wolcott RD, Rumbaugh KP, James G, Schultz G, Phillips P, Yang Q. Biofilm maturity studies indicate Sharp debridement opens a time-dependent therapeutic window. *J Wound Care.* 2010;19(8):320-8.

Zhao G, Usui ML, Lippman SI, James GA, Stewart PS, Fleckman P, et al. *Adv Wound Care.* 2013;2(7):389-99.

Zeytinoglu H, Incesu Z, Baser KH. Inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human N-RAS oncogene. *Phytomedicine.* 2003;10(4):292-9.