

Avaliação Comparativa “In Vivo” da Eficácia do Óleo de *Melaleuca*, Clorexidina e Listerine sobre *Streptococcus mutans* e Microrganismos Totais na Saliva

“In Vivo” Comparative Evaluation of the Efficacy of *Melaleuca* Oil, Chlorhexidine and Listerine against *Streptococcus mutans* and Total Microorganisms in Saliva

Marianne Nicole Marques NOGUEIRA¹, Marília Ferreira CORREIA², Amanda FONTANA³,
Telma Blanca Lombard BEDRAN¹, Denise Madalena Palomari SPOLIDORIO⁴

¹Doutoranda em Odontologia, Área de Peridontia, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Araraquara/SP, Brasil.

²Doutoranda em Clínicas Odontológicas, Área de Odontopediatria, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Araraquara/SP, Brasil.

³Mestranda em Clínicas Odontológicas, Área de Odontopediatria, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Araraquara/SP, Brasil.

⁴Professora do Departamento de Fisiologia e Patologia na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Araraquara/SP, Brasil.

RESUMO

Objetivo: Comparar a eficácia dos enxaguatórios bucais: clorexidina 0,12%, Listerine e óleo de *Melaleuca Alternifolia* 0,5% e 2% sobre os níveis salivares de *Streptococcus mutans* e microrganismos totais.

Métodos: O estudo foi um ensaio clínico, controlado, duplo cego e emparelhado. Para tanto foram selecionados 26 voluntários com idade entre 21 - 35 anos. Foi coletada de cada participante, no baseline, a quantidade de 1 mL de saliva não estimulada, 1 e 15 min após os bochechos com as seguintes soluções: água destilada estéril, digluconato de clorexidina 0,12%, Listerine (©Johnson & Johnson do Brasil), *Melaleuca Alternifolia* (Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA) nas concentrações de 0,5% e 2%. Os participantes fizeram uso de todos os enxaguatórios bucais pesquisados, com intervalo de 15 dias entre cada solução. Imediatamente após o bochecho, foi coletada a saliva e realizadas as diluições seriadas, seguidas de plaqueamento em meio de cultura Agar sangue para o crescimento de microrganismos totais e SB-20 (Agar Sacarose Bacitracina) para *S. mutans*, mantidos por 48h a 37°C em microaerofilia. Após o período de incubação, as colônias foram contadas e transformadas em unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

Resultados: A clorexidina mostrou ação antimicrobiana na redução dos microrganismos totais e *S. mutans*, enquanto a ação do óleo *Melaleuca Alternifolia* 0,5% foi semelhante à água destilada. O listerine e o óleo *Melaleuca Alternifolia* 2% apresentaram redução microbiana, respectivamente, de 11% e 9% para microrganismos totais, entretanto para *S. mutans* o listerine reduziu os níveis em 20% e o óleo *Melaleuca Alternifolia* 2% em 11%.

Conclusão: O bochecho único com clorexidina 0,12% é eficaz na redução de níveis de microrganismos totais e *S. mutans* presentes na saliva. Ao comparar a clorexidina com o listerine e óleo *Melaleuca Alternifolia* 0,5% e 2% nas mesmas condições a eficácia da ação destas soluções é diminuída.

ABSTRACT

Objective: To compare the efficacy of the mouthwashes 0.12% chlorhexidine, Listerine, and 0.5% and 2% *Melaleuca Alternifolia* oil against the salivary levels of *Streptococcus mutans* and total microorganisms.

Methods: This study was double-blind controlled and paired clinical assay. Twenty-six volunteers aged 21 to 35 years old were enrolled. At baseline, 1 mL of unstimulated saliva was collected from each subject, 1 and 15 min after mouthrinsing with the following solutions: sterile distilled water, 0.12% chlorhexidine digluconate, Listerine (©Johnson & Johnson do Brasil), 0.5% and 2% concentrations of *Melaleuca Alternifolia* (Sigma-Aldrich). The volunteers used all the evaluated mouthrinses with a 15-day interval between the solutions. Immediately after rinsing, saliva was collected and serial dilutions were performed, followed by plating in blood agar culture medium for growth of total microorganisms and SB-20 (Sucrose-Bacitracin agar) for growth of *S. mutans*, and incubation at 37 °C for 48 h in microaerophilia. After incubation, the number of colonies was counted and expressed as colony forming units (UFC/mL).

Results: Chlorhexidine showed antimicrobial action by reducing total microorganisms and *S. mutans*, while the action of 0.5% *Melaleuca Alternifolia* was similar to that of distilled water. Listerine and 2% *Melaleuca Alternifolia* oil reduced total microbial counts by 11% and 9% respectively, and *S. mutans* by 20% and 11%.

Conclusion: A single rinse with 0.12% chlorhexidine is effective in reducing the levels of total microorganisms and *S. mutans* present in saliva. Under the same testing conditions, Listerine and 0.5% and 2% *Melaleuca Alternifolia* oil presented lower efficacy than chlorhexidine.

DESCRIPTORES

Óleo de Melaleuca; Óleos essenciais; *Streptococcus mutans*; saliva.

KEY-WORDS

Tea tree oil; Oils volatile; *Streptococcus mutans*; saliva.

INTRODUÇÃO

A cárie é uma doença crônica, de origem multifatorial e considerada uma das principais causas de perda dentária. O biofilme dentário é o iniciador deste processo. Ele sofre alterações na sua composição por meio da ingestão de substratos fermentáveis provenientes da dieta. Assim, um alto consumo de carboidratos fermentáveis favorecerá a colonização por bactérias acidúricas e acidogênicas, ocasionando a desmineralização dentária. O *Streptococcus mutans* é uma espécie considerada extremamente acidúrica e acidogênica, podendo estar presente em grande quantidade nos biofilmes cariogênicos. O controle do biofilme dentário manterá a saúde bucal além de prevenir complicações sistêmicas em pacientes debilitados. Para o efetivo controle da cárie é necessária a escovação, para que provoque a desorganização do biofilme e associado a isto o uso do flúor. Em regiões como cicatrículas, fissuras e áreas interproximais, o controle mecânico pode apresentar falhas e pacientes com problemas motores apresentam maiores dificuldades de executar escovação com eficácia¹⁻⁴.

Os métodos auxiliares, como a utilização de agentes químicos, em cremes dentais ou em soluções para bochecho, podem contribuir nestes casos diminuindo o número de microrganismos responsáveis pelo aparecimento e progressão de problemas bucais¹⁻⁴.

A clorexidina tem 30 anos de história na odontologia e é a solução mais usada e também mais pesquisada. Possui ação antibiofilme e antigengivite e por isso é considerado padrão-ouro em pesquisa^{5,6}. O bochecho com clorexidina 0,12% tem o poder de redução imediata de microrganismos em cerca de 90%. Seu efeito pode permanecer de 30 segundos a 1h após o bochecho, possuindo também efeito residual de até 7h^{7,8}. Na concentração de 0,2% diminui de forma significativa os níveis de microrganismos Gram-positivos com 1 min do bochecho⁶. Apesar dos efeitos benéficos da clorexidina, ela possui uma grande desvantagem que é a coloração dos dentes, alterações gustativas e gosto metálico na boca, tais desvantagens limitam o seu uso e tem servido de incentivo para a pesquisa de soluções substitutas sem os efeitos colaterais^{5,6}.

O Listerine, enxaguatório bucal, muito utilizado na odontologia é composto por óleos essenciais (timol, mentol, eucaliptol e metilsalicilato) e fenóis com a capacidade de diminuir a viabilidade dos microrganismos na saliva¹. O seu uso regular possui bom efeito no controle do biofilme dentário e da gengivite. O uso prolongado tem demonstrado segurança e ausência de resistência antimicrobiana bem como de efeitos colaterais desagradáveis como pigmentação das superfícies. Como desvantagem, o Listerine tem um gosto muito forte que em alguns pacientes pode levar à sensação de queimação e em algumas apresentações há elevado teor de álcool o que pode levar a injúrias na mucosa¹.

Assim, aumenta-se a busca por novos compostos químicos, que não gerem tantos efeitos colaterais como, por exemplo, o uso de extratos vegetais e compostos fitoquímicos, os quais possuem boas propriedades antimicrobianas associadas a mínimos efeitos colaterais. Com isso, os fitoterápicos tem sido alvo de pesquisas e sugeridos como veículos de prevenção e controle de doenças bucais infecciosas, uma vez que seu mecanismo de ação antimicrobiano consiste no comprometimento da integridade da membrana celular com perda de material intracelular e inibição da respiração⁹.

O uso de extratos vegetais e compostos fitoquímicos vem ganhando força na medicina, sendo que uma grande porcentagem das novas moléculas descobertas, com vistas à sua introdução na indústria farmacêutica, provém de constituintes de plantas e/ou derivados semissintéticos⁹.

A *Melaleuca alternifolia* é uma planta nativa da Austrália da família Myrtaceae, conhecida por tea tree oil – TTO e a sua forma de uso é o óleo essencial que é obtido por destilação a vapor das folhas. Na medicina, o TTO é utilizado no controle de infecções e inflamações na pele, queimaduras, picadas de inseto, gel para espinhas, cremes vaginais e cremes para a pele. Possui também excelentes propriedades medicinais com ação antibacteriana¹⁰, antifúngica⁹, antiviral¹¹, anticancerígena¹² e anti-inflamatória¹³. Em odontologia, o seu uso ainda não é muito difundido e tal escassez pode ser pela pouca informação sobre o TTO e sua ação nas doenças bucais¹⁴⁻¹⁶.

O TTO tem comprovada ação sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, mas ainda são escassas as evidências clínicas da ação antimicrobiana do TTO sobre os patógenos bucais^{10,17}. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação de duas concentrações do TTO (0,5% e 2%) na redução dos microrganismos totais e *S. mutans* presentes na saliva com um único bochecho, como também avaliar reações adversas como ardência e sabor desagradável.

METODOLOGIA

Preparo do TTO

A cromatografia gasosa do TTO (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, EUA) foi realizada no Instituto de Química de São Carlos - USP, para avaliar o controle de qualidade do óleo de acordo com a ISO 4730 (Quadro 1). O TTO foi diluído em água destilada estéril para obtenção da concentração final de 0,5% e 2%. O Tween 20 na concentração final de 0,1% foi adicionado ao óleo para aumentar a solubilidade.

Amostra

Este trabalho foi um ensaio clínico duplo-cego, controlado e emparelhado (a mesma variável foi medida antes e depois do tratamento nos mesmos sujeitos).

Todos os participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Comitê de Ética em Pesquisa - CEP da Faculdade de Odontologia de Araraquara sob o nº 39/09 da Universidade Estadual Paulista-Unesp em 2009).

O cálculo da amostra foi realizado considerando um nível de significância de 5% e de 0,95 de poder do estudo, sendo selecionados 26 voluntários que apresentavam boa saúde sistêmica. O paciente foi seu próprio controle. Os critérios de exclusão foram história de antibioticoterapia nos últimos seis meses; uso de anti-inflamatórios nos últimos três meses; fumantes; gravidez; uso de anticoncepcionais e/ou qualquer outra forma de hormônio; uso de aparelho ortodôntico fixo ou móvel e uso de prótese removível e fixa.

Quadro 1. Composição química do óleo de *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil – TTO), segundo a ISO (International Organization for Standardization) 4730.

Componente	Composição (%) ISO 4730
Terpinen-4-ol	≥30
γ-Terpinene	10-28
α-Terpinene	5-13
1,8-Cineole	≤15
Terpinolene	1,5-5
p-Cimeno	0,5-12
α-Pineno	1-6
α-Terpineol	1,5-8
Aromadendreno	Trace -7
δ-Cadineno	Trace -8
Limoneno	0,5-4
Sabineno	Trace -3,5
Globulol	Trace -3
Viridiflorol	Trace -1,5

Fonte: Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. Clin Microbiol Rev. 2006;19(1):50-62 (15)

Desenho do estudo

Os enxaguatórios bucais analisados foram: Listerine, TTO 0.5% e 2% (soluções teste). Os grupos controles utilizados foram clorexidina 0.12% e água destilada estéril.

Todos os participantes foram instruídos a não realizarem qualquer técnica de higiene bucal na noite anterior e na manhã do experimento. Os mesmos também foram instruídos a não ingerirem comida e bebida antes e durante o curso do experimento.

Previamente à realização de cada bochecho, 1 mL de saliva não estimulada foi coletada de cada participante, a qual foi considerada como baseline. As soluções foram selecionadas aleatoriamente para cada indivíduo com bochechos tanto das soluções teste como as soluções controle. Em seguida, os participantes foram instruídos a realizar um bochecho com 10 mL da solução em estudo, durante 60 segundos. Após 1 e 15 min da realização do bochecho, foi coletada 1 mL de saliva não estimulada. Todos os participantes repetiram este procedimento para cada solução analisada, com um intervalo de 15 dias entre elas. Para padronização da pasta de dente a ser utilizada durante o estudo, foi

escolhido o creme dental Tandy (Colgate-Palmolive Company®) por possuir o fluoreto de sódio (NaF) 1100ppm. Os pacientes não receberam nenhum tipo de instrução de higiene oral.

Análise qualitativa do óleo

Imediatamente após a realização do bochecho, cada voluntário recebeu um questionário sobre sabor e queimação das soluções testadas, que foram quantificadas em uma escala ordinal com notas atribuídas de 0 a 10 (Quadro 2). Após obtenção das notas, estes valores foram categorizados e distribuídos em uma nova escala (Quadro 3).

Quadro 2. Questionário aplicado aos voluntários com a análise qualitativa dos enxaguatórios utilizados na pesquisa. Araraquara, 2012.

1. Ardência ou queimação da boca pelo uso da solução;

0 Nada 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 insuportável

2. Gosto desagradável;

0 Nada 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 insuportável

Quadro 3. Categorização das informações obtidas no questionário sobre a análise qualitativa dos enxaguatórios. Araraquara, 2012.

0	Nenhuma sensação
0 e ≤3	Sensação leve
3 > e ≤5	Sensação moderada
5 > e ≤8	Sensação grave
8 > e ≤10	Muito grave

Processamento das amostras

Após a coleta, as amostras de saliva foram homogeneizadas em agitador de tubo (Vortex, Phoenix AT 56, Munising, MI, EUA) durante 1 min e, em seguida, foram diluídas seis séries em solução PBS estéril e semeadas em duplicata em placas de cultura contendo dois meios seletivos: Agar Sangue (base de agar com sangue de ovelha desfibrinado a 5%) para crescimento de microrganismos totais e SB-20 (Agar de Sacarose Bacitracina) para o crescimento de *S. mutans*. O SB-20 contém sacarose e bacitracina deixando-o seletivo para o *S. mutans*¹⁸. Todas as placas foram incubadas a 37°C em microaerofilia durante 48h e o número total de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foi expresso em logaritmo decimal (log₁₀ UFC/mL).

Análise estatística

A significância do efeito de enxaguatórios bucais sobre microrganismos totais e *S. mutans* nos três tempos coletados foram avaliados com Anova de medidas repetidas. Para identificar quais pares de médias diferiram entre si, para a interação entre os fatores e para os momentos de coleta avaliados, procedeu-se a comparação múltipla de médias com correção de Bonferroni¹⁹.

O teste não paramétrico de Friedman foi utilizado para verificar a significância estatística da ardência e do gosto dos enxagatórios bucais, os quais foram avaliados pelos voluntários, sendo medidos através de uma escala ordinal que variava de 0 (muito agradável ao paladar) a 10 (muito desagradável ao paladar). (Quadro 2). Os dados obtidos sofreram uma categorização para melhor análise estatística (Quadro 3). Para identificar significativamente os enxagatórios que obtiveram melhor aceitação por parte dos voluntários, realizou-se a comparação múltipla de média de ordens para amostras emparelhadas¹⁹. Todos os testes estatísticos foram realizados pelo software PASW Statistics (v. 17, SPSS Inc, Chicago, IL), considerando-se uma probabilidade de erro tipo I (α) de 0,05.

RESULTADOS

Participaram deste estudo 26 sujeitos (15 mulheres e 11 homens), com idade média de $25 \pm 3,37$ anos. Não houve diferença estatística entre os indivíduos na contagem de microrganismos no baseline, indicando que a amostra era homogênea. Entretanto, comparando-se todas as soluções nas coletas de 1 e 15 min após a administração dos bochechos, houve diferença estatística apenas para a clorexidina (Tabela 1).

Quantificação de microrganismos totais

A água destilada apresentou diferença estatisticamente significativa entre o baseline e os momentos após o bochecho, quando comparada com ela mesma, indicando uma possível ação mecânica com redução em torno de 7% da microbiota 1 e 15 min após o bochecho (Tabela 1).

A clorexidina reduziu de forma significativa a contagem dos microrganismos totais presentes na saliva, após a administração da solução quando comparada ao baseline. No primeiro minuto após o bochecho, o poder de redução foi em torno de 75% e após 15 min o poder de redução foi de 50%.

O listerine reduziu a microbiota no primeiro minuto (11%) e com 15 min (9%).

O TTO 0.5% não apresentou nenhuma ação antimicrobiana. O TTO 2% apresentou redução estatisticamente significativa após 1 min do bochecho (9%), e após 15 min o percentual de redução foi de 5,2% quando comparado ao baseline (Tabela 1).

Quantificação de *S. mutans*

A contagem de *S. mutans* 1 e 15 min, após a administração de clorexidina (0.12%), foi nula, mostrando redução estatisticamente significativa quando comparada ao baseline (Tabela 2). Dessa forma, ao comparar o efeito da clorexidina, que conseguiu zerar os valores, com os demais enxagatórios (água destilada, Listerine e TTO) que não apresentaram tamanha redução, a diferença estatística não foi significativa.

A água destilada e o TTO 0.5% não apresentaram diferença na contagem do microrganismo entre os momentos coletados, indicando ausência de ação mecânica do bochecho na redução dos níveis de *S. mutans* (Tabela 2).

O Listerine apresentou redução de 20% nos níveis salivares de *S. mutans*, 1 e 15 min após a sua administração, quando comparados ao baseline, porém essa redução não foi significativa quando comparado com a clorexidina (Tabela 2).

O TTO 2% apresentou redução significativa de 11% no primeiro minuto após o bochecho, quando comparado ao baseline, entretanto após 15 min a contagem de *S. mutans* se elevou (Tabela 2).

Tabela 1. Microrganismos totais (log UFC/mL) na saliva humana em diferentes períodos (média \pm desvio-padrão).

	Baseline	0h 1m 0s	0h 15m 0s
Água destilada	9,22 \pm 0,63 ^{Aa}	8,50 \pm 1,13 ^{Ab}	8,44 \pm 0,24 ^{Ab}
Clorexidina	9,15 \pm 1,16 ^{Aa}	2,30 \pm 3,51 ^{Bb}	4,78 \pm 3,53 ^{Bc}
Listerine	8,43 \pm 0,66 ^{Aa}	7,50 \pm 0,57 ^{Ab}	7,67 \pm 1,01 ^{Ab}
<i>Melaleuca alternifolia</i> (tea tree oil – TTO) 0.5%	8,73 \pm 0,92 ^{Aa}	8,50 \pm 0,64 ^{Aa}	8,67 \pm 0,89 ^{Aa}
<i>Melaleuca alternifolia</i> (tea tree oil – TTO) 2%	8,50 \pm 0,62 ^{Aa}	7,72 \pm 0,56 ^{Ab}	8,05 \pm 0,94 ^{Ac}

Letras maiúsculas distintas representam diferença estatisticamente significativa entre os enxagatórios no mesmo momento de coleta (colunas). Letras minúsculas distintas indicam diferença estatisticamente significativa entre os momentos de coleta para o mesmo enxagatório (linhas).

Anova de medidas repetidas ($p > 0,05$).

Tabela 2. *S. mutans* (log UFC/mL) na saliva humana em diferentes períodos (média \pm desvio-padrão).

	Baseline	0h 1m 0s	0h 15m 0s
Água destilada	5,36 \pm 0,85 ^{Aa}	5,06 \pm 0,86 ^{Aa}	5,08 \pm 0,72 ^{Aa}
Clorexidina	5,13 \pm 0,85 ^{Aa}	0 \pm 0,00 ^{Bb}	0 \pm 0,00 ^{Bb}
Listerine	6,34 \pm 0,97 ^{Aa}	5,08 \pm 1,45 ^{Ab}	5,60 \pm 0,86 ^{Ab}
<i>Melaleuca alternifolia</i> (tea tree oil – TTO) 0.5%	5,49 \pm 0,71 ^{Aa}	5,05 \pm 1,36 ^{Aa}	5,07 \pm 0,65 ^{Aa}
<i>Melaleuca alternifolia</i> (tea tree oil – TTO) 2%	5,44 \pm 0,92 ^{Aa}	4,82 \pm 1,38 ^{Ab}	4,95 \pm 1,74 ^{Aab}

Letras maiúsculas distintas representam diferença estatisticamente significativa entre os enxagatórios no mesmo momento de coleta (colunas). Letras minúsculas distintas indicam diferença estatisticamente significativa entre os momentos de coleta para o mesmo enxagatório (linhas).

Anova de medidas repetidas ($p > 0,05$).

Análise dos efeitos adversos

O Listerine apresentou sensação severa de ardência, com diferença significativa para as demais

soluções. Entretanto, para o gosto, a sensação desagradável foi leve. A clorexidina, o TTO 0.5% e TTO 2% apresentaram pontuação moderada para a ardência, porém a pontuação foi grave para o gosto (Figuras 1 e 2).

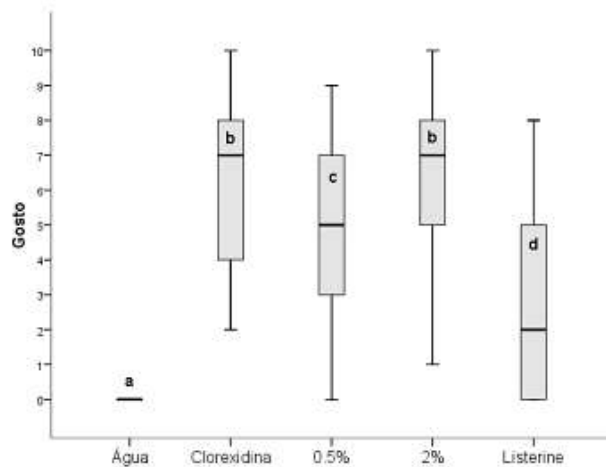


Figura 1. Efeitos adversos relacionados após a administração de diferentes enxaguatórios, representando a mediana e os quartis do item ardência. A pontuação 10 revela sensação severa e a 0 nenhuma sensação. Letras diferentes revelam diferença significativa. Friedman ($p > 0,05$).

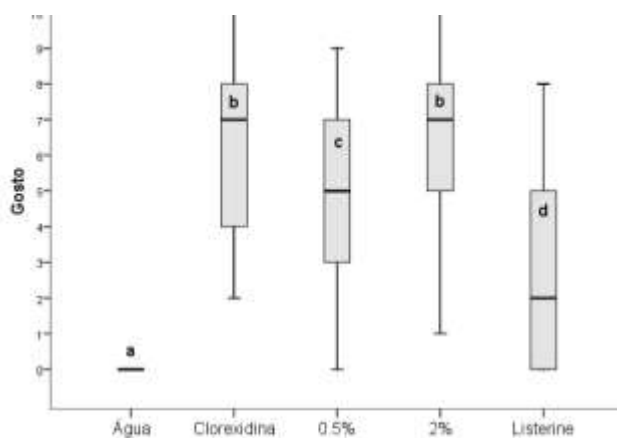


Figura 2. Efeitos adversos relacionados após a administração de diferentes enxaguatórios, representando a mediana e os quartis do item gosto. A pontuação 10 revela sensação severa e a 0 nenhuma sensação. Letras diferentes revelam diferença significativa. Friedman ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

As soluções antissépticas são utilizadas em diversas situações, tanto profiláticas quanto terapêuticas. A clorexidina é considerada o padrão-ouro em pesquisas odontológicas, pelos excelentes resultados para o controle da microbiota, entretanto, apresenta diversos efeitos colaterais, como manchamento dentário e em restaurações estéticas, alteração no paladar e gosto metálico. Assim, compostos fitoterápicos como, por

exemplo, o TTO, que produzem menos efeitos adversos quando comparados à clorexidina, são pesquisados como alternativa de tratamento, uma vez que já foi comprovada sua ação antimicrobiana, antiviral, antifúngica e anti-inflamatória²⁰.

Este estudo foi desenvolvido para avaliar a eficácia do TTO em duas concentrações diferentes (0.5% e 2%) em bochecho único comparado com o Listerine. A clorexidina 0.12% e a água destilada foram incluídas neste estudo, respectivamente, como controle positivo e placebo. Para avaliar a eficácia dos diferentes produtos, escolheu-se o método quantitativo de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL), que pode ser descrito como um método eficaz e estabelecido na literatura para investigação da atividade antimicrobiana das soluções antissépticas em experimentos "in vivo"^{17,21,22,23}.

No presente estudo, o TTO 2% foi capaz de reduzir a quantidade de microrganismos totais e *S. mutans*, quando comparado com água destilada (placebo). Entretanto, os resultados não foram estatisticamente significantes (Tabelas 2 e 3). Quando os cinco grupos foram comparados entre si, somente a clorexidina apresentou diferença estatisticamente significativa (Tabelas 2 e 3).

Em uma comparação da eficácia do bochecho do TTO 0.34% no crescimento e viabilidade do biofilme supragengival versus bochecho com clorexidina 0.12% e placebo, os resultados mostraram que a clorexidina inibiu a formação do biofilme dentário, enquanto que o TTO não mostrou redução na formação do biofilme²². Dessa forma, esses resultados corroboram com nossos achados, mostrando que o TTO não possui forte ação antimicrobiana, e comprovando a eficácia da Clorexidina.

Ao comparar os enxaguatórios separadamente, isto é o baseline, 1 min e 15 min, os resultados apresentaram diferenças significativas para a contagem de microrganismos totais, indicando que os enxaguatórios reduziram a microbiota nos momentos estudados e a clorexidina apresentou maior potencial de redução.

O Listerine, quando comparado com o TTO 2%, apresentou maior potencial de redução dos microrganismos totais e maior substantividade, o que não foi observado em um outro trabalho que encontrou que o TTO 0.2% teria grande efeito residual². Esse mesmo trabalho reportou a atividade antimicrobiana do TTO 0.2% e de outros dois antimicrobianos (clorexidina 0.12% e o alho) contra os microrganismos totais e *S. mutans*. Após sete dias de bochecho, foi observado redução dos microrganismos avaliados nos pacientes que utilizaram TTO, sendo este efeito mantido por mais duas semanas. Este efeito não foi observado nos outros dois antimicrobianos utilizados².

Os resultados apresentados no presente trabalho diferem do acima citado, provavelmente justificado pelo tempo reduzido de utilização do enxaguatório (60 segundos), pois nosso objetivo foi avaliar somente o efeito imediato das soluções sobre microrganismos orais. O que pode ter acontecido é que

uma exposição constante ao enxaguatório, do estudo citado anteriormente, tenha permitido maior tempo de exposição aos microrganismos e melhor ação dos produtos. Na análise de *S. mutans*, no presente trabalho, o TTO não apresentou diferença significativa em nenhuma das concentrações avaliadas, ao contrário do observado no trabalho que utilizou concentração dez vezes menor².

A avaliação do Listerine® mostrou queda de 20% dos microrganismos e estes se mantiveram nos 15 min seguintes. Comparando-se este valor com a clorexidina, não se obtiveram resultados estatisticamente significativos, pelos valores nulos da clorexidina que elevou a diferença significativa. A ação mecânica do bochecho com água destilada não apresentou efeito para *S. mutans*. A ausência da ação mecânica do bochecho sobre esse microrganismo pode estar relacionada com a produção de polissacarídeos extracelulares, capazes de promover aderência dos mesmos às superfícies dentárias, o que dificultaria a remoção mecânica através de um simples bochecho^{23,24}.

O presente estudo apresentou limitações como o fato de avaliar que soluções em um momento único de exposição, já que o objetivo deste estudo foi avaliar o poder de redução imediata dos valores de microrganismos totais e *S. mutans* presentes na saliva. Como neste trabalho não foi realizada análise da ação antimicrobiana do uso prolongado dos enxaguatórios, esses resultados não reproduziram os relatados na literatura, onde se observa um efeito antimicrobiano tanto para o TTO quanto para o Listerine.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o TTO 2% reduz a quantidade de microrganismos totais e *S. mutans* igualmente ao Listerine®. Entretanto, o Listerine® possui maior efeito residual e com isso foi capaz de manter sua ação antimicrobiana por 15 min após a administração do bochecho, o que não ocorreu com o TTO 2%.

Com relação aos efeitos adversos testados, o TTO 2% não apresentou ardência quando comparado ao Listerine®, entretanto, o gosto desagradável foi equivalente ao da clorexidina.

Considerando as limitações deste estudo podemos concluir que o TTO e o Listerine® utilizados como enxaguatório bucal para redução dos níveis de microrganismos em bochecho único de 60 segundos não é efetivo para procedimentos de desinfecção.

REFERÊNCIAS

1. Agarwal P, Nagesh L. Comparative evaluation of efficacy of 0.2% Chlorhexidine, Listerine and Tulsi extract mouth rinses on salivary *Streptococcus mutans* count of high school children-

RCT. Contemp Clin Trials 2011; 32(6):802-8.

2. Groppo FC, Ramacciato JC, Simões RP, Flório FM, Sartoratto A. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. Int Dent J 2002; 52(6):433-7.

3. Ditterich RG, Romanelli MCMOV, Rastelli MC, Portero PP, Santos EB. Atividade antimicrobiana "in vitro" de substâncias naturais presentes nos dentífricos. Odontol Clin Cientif 2007; 6(14):303-7.

4. Ghasempour M, Rajabnia R, Irannejad A, Hamzeh M, Ferdosi E, Bagheri M. Frequency, biofilm formation and acid susceptibility of streptococcus mutans and streptococcus sobrinus in saliva of preschool children with different levels of caries activity. Dent Res J 2013; 10(4):440-5.

5. Løe H, Schiött CR. The effect of mouth rinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. J Periodontal Res 1970; 5(2):79-83.

6. Kocat MM, Ozcanb S, Kocakb S, Topuzc O, Ertend H. Comparison of the Efficacy of Three Different Mouthrinse Solutions in Decreasing the Level of Streptococcus Mutans in Saliva. Eur J Dent 2009; 3(1):57-61.

7. Herrera D, Roldán S, Santacruz I, Santos S, Masdevall M, Sanz M. Differences in antimicrobial activity of four commercial 0.12% chlorhexidine mouthrinse formulations: an in vitro contact test and salivary bacterial counts study. J Clin Periodontol 2003; 30(4):307-14.

7. Cousido MC, Carmona IT, García-Caballero L, Limeres J, Álvarez M, Diz P. In vivo substantivity of 0.12% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses on salivary bacteria. Clin Oral Invest 2010; 14(4):397-402.

8. Catalán A, Pacheco JG, Martínez A, Mondaca MA. In vitro and in vivo activity of Melaleuca alternifolia mixed with tissue conditioner on Candida albicans. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008; 105(3):327-32.

9. Kwiecinski J, Eick S, Wójcik K. Effects of tea tree (Melaleuca alternifolia) oil on Staphylococcus aureus in biofilms and stationary growth phase. Int J Antimicrob Agents 2009; 33(4):343-7.

10. Minami M, Kita M, Nakaya T, Yamamoto T, Kuriyama H, Imanishi J. The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication in vitro. Microbiol Immunol 2003; 47(9): 681-4.

11. Greay SJ, Ireland DJ, Kissick HT, Levy A, Beilharz MW, Riley TV, Carson CF. Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by Melaleuca alternifolia (tea tree) oil and terpinen-4-ol. Cancer Chemother Pharmacol 2010; 65(5):877-88.

12. Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. Inflamm Res 2000; 49(11):619-26.

13. Cox SD, Mann CM, Markham JL. Interactions between components of the essential oil of Melaleuca alternifolia. J Appl Microbiol 2001; 91(3):492-7.

14. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. Clin Microbiol Rev 2006; 19(1):50-62.

15. Oliveira ACM, Fontana A, Negrini TC, Nogueira MNM, Bedran TBL, Andrade CR, Spolidorio LC, Spolidorio DMP. Emprego do óleo de Melaleuca alternifolia Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal. Rev Bras PI Med 2011; 13(4):492-9.

16. Thomsen PS, Jensen TM, Hammer KA, Carson CF, Mølgaard P, Riley TV. Survey of the Antimicrobial Activity of Commercially Available Australian Tea Tree (Melaleuca alternifolia) Essential Oil Products In Vitro. J Altern Complement Med 2011; 17(9):835-41.

- 17 Marroco J. Análise estatística com o PASW Statistics (ex-SPSS). Report number, Lda: Perô Pinheiro. 2010.
- 18 Davey AL, Rogers AH. Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. *Archs Oral Biol* 1984; 29(6):453-60
- 19 Hammer KA, Dry L, Johnson M, Michalak EM, Carson CF, Riley TV. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18(6):389-92.
- 20 Navazesh M, Christensen CM. A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurement procedures. *J Dent Res* 1982; 61(10):1158-62.
- 20 Addy M, Moran JM. Evaluation of oral hygiene products: science is true; don't be misled by the facts. *Periodontol* 2000 1997; 15:40-51.
- 21 Jenkins S, Addy M, Wade W, Newcombe RG. The magnitude and duration of the effects of some mouthrinse products on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1994; 21(6):397-401.
- 22 Arweiler NB, Donos N, Netuschil L, Reich E, Sculean A. Clinical and antibacterial effect of tea tree oil – a pilot study. *Clin Oral Investg* 2000; 4(2):70-3.
- 23 Rölla G. Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides. *Scand J Dent Res* 1989; 97(2):115-9.
- 24 Schilling KM, Bowen WH. Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 1992; 60(1):284-95.

Recebido/Received: 06/11/2012

Revisado/Reviewed: 09/08/2013

Aprovado/Approved: 11/09/2013

Correspondência:

Marianne Nicole Marques Nogueira

R. Major Basílio, 491 apt 231

Mooca, São Paulo, Brasil

CEP: 03181-010

E-mail: nicolenogueira2@yahoo.com.br