



UNESP – Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Yasmin Etienne Albuquerque

**Atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais contra
micro-organismos orais**

Araraquara

2018



UNESP – Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Yasmin Etienne Albuquerque

**Atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais contra
micro-organismos orais**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, área de Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Doutora em Ciências Odontológicas.

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Fernanda Lourenção Brighenti

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos José Salvador

Araraquara

2018

Albuquerque, Yasmin Etienne

Atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais
contra micro-organismos orais/ Yasmin Etienne Albuquerque. --

Araraquara: [s.n.], 2018

123 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Ciências Odontológicas) – Universidade
Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos José Salvador

1. Plantas medicinais 2. Produtos com ação antimicrobiana
3. Placa dentária I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C.C.Montagnoli, CRB-8/5646

Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

Yasmin Etienne Albuquerque

**Atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais contra
micro-organismos orais**

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

COMISSÃO JULGADORA

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti

2º Examinador: Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

3º Examinador: Profa. Dra. Marlise Inêz Klein Furlan

4º Examinador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

5º Examinador: Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza

Araraquara, 22 de novembro de 2018.

Yasmin Etienne Albuquerque

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 05/09/1989 – São Carlos – SP

Filiação: Aldir José Gonçalves Albuquerque e Sonia Romão de Carvalho
Albuquerque

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2008 - 2012: Curso de Graduação - Faculdade de Odontologia de Araraquara
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

2013 - 2015: Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de
Concentração em Odontopediatria – Curso de Mestrado, - Faculdade de
Odontologia de Araraquara Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”.

2015 - 2018: Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de
Concentração em Odontopediatria – Curso de Doutorado, - Faculdade de
Odontologia de Araraquara Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”.

ASSOCIAÇÕES

Sociedade Brasileira de Pesquisa em Odontologia – SBPqO

Dedico este trabalho...

Ao meu pai Aldir (in memoriam).

Mesmo tendo o destino nos privado de estarmos juntos, espero que onde estiver receba os meus mais sinceros sentimentos de saudade. Queria que estivesse aqui. Poder te ver feliz ao me ver realizar os meus sonhos, que de certo modo também eram os seus sonhos.

Agradecimentos especiais

A minha mãe Sonia, por todo auxílio e amor e por me fortalecer quando tudo ao meu redor parecia estar ruim.

As técnicas do laboratório de Pesquisa Bioquímica e Microbiológica da FOAr, Gabriela e Gabrielle, por todo o auxílio e amizade.

Aos colegas Aline, Analú, Juliana, Lana, Luís Felipe, Marina, Natália, Rafael e Paulo pela indispensável contribuição nesse trabalho e pelas ótimas lembranças.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por ter me dado forças para continuar em frente durante os momentos de tormenta.

À minha mãe Sonia, as minhas irmãs Yanick e Yulli e ao meu cunhado Ricardo, pelo apoio, torcida e auxílio na concretização desse trabalho.

Aos meus eternos amores Lucky e Alberto, pelo mais puro e sincero amor expressos em cada olhar e em cada pedido de colo.

À minha Orientadora, Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti, pela confiança, paciência e contribuição na minha formação profissional.

Aos meus queridos amigos Pamella, Lana, Eliana, Marina e Berg.
A amizade de vocês não tem preço.

Aos meus amigos de WhatsApp Cleiton e Fábio. Por todo auxílio, por ouvir meus desabafos, debates e momentos de descontração.

Às alunas e aos alunos de Pós-doutorado, Doutorado, Mestrado e Iniciação Científica: Camila, Giovana, Vinícius, Natália, Carol Mendes, Carol Becci, Ila, Luís Felipe, Juliana, Aline, Analú, Rafael, Raquel, Lorena, Bárbara, Paula, Marília e Talita. Admiro todos vocês.

Aos colegas da Faculdade de Odontologia de Araraquara: Elkin, Guilherme, Jéssika, Luana, Bruna, Geise, por todo o auxílio prestado.

À Profa. Dra. Marlise Klein. Por todo o auxílio e disposição em me ajudar durante a realização do meu projeto.

Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro, Profa. Dra. Rita Loiola Cordeiro, Profa. Dra. Josimeri Hebling Costa, Profa. Dra. Lourdes Aparecida Martins dos Santos Pinto, Profa. Dra. Ângela Cristina Cilense Zuanon, Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani e Prof. Dr. Fabiano Jeremias.

Aos professores colaboradores deste trabalho, Prof. Dr. Marcos José Salvador, Prof. Dr. Román Rueda, Profa. Dra. Glyn Maria Figueira e Profa. Dra. Natália Inada.

Aos funcionários do laboratório de ortodontia: Totó, Diego e Pedrinho, por todo o auxílio e carinho.

À secretária do Departamento de Clínica infantil, Soninha e as funcionária da Clínica Infantil, Dulce e Flávia. Obrigada por tudo!

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP, pela atenção, ajuda e disponibilidade com que me atendem sempre.

Aos funcionários da Diretoria Técnica de Informática da Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP, Alex, Ivan e Joel, por todo o suporte técnico.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, pelo profissionalismo e atenção.

A todos os funcionários da FOAr, por todo o suporte técnico e atenção carinhosa.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, na pessoa da coordenadora Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, na pessoa das professoras Profa. Dra. Elaine Massucato, digníssima Diretora e Prof. Dr. Edson Campos, digníssimo Vice-Diretor.

À CAPES: o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a
realização deste projeto, minha eterna gratidão.

“Prepare o seu coração
pras coisas que eu vou contar...

...Aprendi a dizer não,
ver a morte sem chorar
E a morte, o destino, tudo,
a morte e o destino, tudo
Estava fora de lugar,
eu vivo pra consertar

Na boiada já fui boi,
mas um dia me montei
Não por um motivo meu,
ou de quem comigo houvesse
Que qualquer querer tivesse,
porém por necessidade
Do dono de uma boiada
cujo vaqueiro morreu...

...Mas o mundo foi rodando
nas patas do meu cavalo
E já que um dia montei
agora sou cavaleiro
Laço firme e braço forte
num reino que não tem rei.”

(Vandré e Barros, 1966)*

*A G, Barros T. Disparada. In: Rodrigues J. Disparada [CD]. Rio de Janeiro: Emi Music; 2013. 1 CD, Faixa 4.

Albuquerque YE. Atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais contra micro-organismos orais [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram: a) realizar uma revisão crítica sobre as plantas listadas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) que apresentam evidência de atividade antimicrobiana contra micro-organismos cariogênicos (Publicação 1); b) avaliar e comparar a atividade antibacteriana e anti-aderente de óleos essenciais de plantas incluídas na RENISUS obtidos de duas fontes (Publicação 2); c) comparar o comportamento de biofilmes de *Streptococcus mutans* com biofilmes polimicrobianos e avaliar a citotoxicidade e a capacidade de óleos essenciais de plantas incluídas na RENISUS em interferir na maturação desses biofilmes (Publicação 3).

Publicação 1: foram selecionados artigos que avaliaram extratos de plantas listadas na RENISUS contra micro-organismos cariogênicos. Apenas 17 das 71 plantas da RENISUS foram estudadas. Dos 24 estudos in vitro, apenas 6 realizaram testes com biofilmes. Apenas *Lippia sidoides* e *Punica granatum* foram avaliadas em estudos clínicos randomizados ou cruzados.

Publicação 2: de cada espécie vegetal selecionada foram obtidas duas amostras de óleos essenciais de fontes diferentes (Fonte comercial: Empórios Laszlo ou Quinari; Fonte ex-situ: Banco de germoplasma). Foram utilizados micro-organismos orais de referência (*Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus mitis*). Para fins comparativos, foi utilizado o digluconato de clorexidina 0,12% (CHX). A concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais foram determinadas. Os óleos essenciais mais ativos (*Cordia curassavica* e *Eugenia uniflora* da Fonte comercial e *Eugenia uniflora* e *Tagetes minuta* da Fonte ex-situ) foram avaliados em concentrações sub-inibitórias quanto à sua atividade anti-aderente e caracterizados quimicamente. Os óleos essenciais de *C. curassavica* (Fonte comercial) e *T. minuta* (Fonte ex-situ) apresentaram atividade anti-aderente contra um maior número cepas. Os constituintes majoritários dos óleos

essenciais são sesquiterpenos. Publicação 3: os óleos essenciais foram avaliados quanto à CIM e CBM de *S. mutans* e inóculo polimicrobiano proveniente de saliva humana. Os óleos essenciais mais ativos foram avaliados quanto à capacidade em interferir na maturação de biofilmes. Os biofilmes foram analisados quanto a sua acidogenicidade, composição microbiana e bioquímica. A citotoxicidade dos óleos essenciais ativos em biofilmes foi avaliada utilizando cultura de fibroblastos e queratinócitos. O óleo de *E. uniflora* de ambas as fontes foi o mais ativo e foi capaz de reduzir a viabilidade e a acidogenicidade dos biofilmes e apresentaram citotoxicidade menor ou igual a CHX. Biofilmes polimicrobianos apresentaram comportamento diferente em comparação à biofilmes de *S. mutans* (menor viabilidade, maior acidogenicidade e maior concentração de compostos bioquímicos). Conclusão geral: poucas plantas listadas na RENISUS foram avaliadas quanto ao seu potencial anticariogênico (Publicação 1). Os óleos essenciais de *C. curassavica* (Fonte comercial) e *T. minuta* (Fonte ex-situ) apresentaram melhor atividade anti-aderente. Óleos essenciais obtidos de fonte comercial podem ser tão efetivos quanto os óleos obtidos de coleções ex-situ (Publicação 2). O óleo essencial de *E. uniflora* de ambas as fontes foram efetivos em biofilmes. Biofilmes monotípicos podem superestimar a ação antimicrobiana de produtos naturais, sendo indicado então, para estudos in vitro, o uso de biofilmes polimicrobianos (Publicação 3).

Palavras-chave: Plantas medicinais. Produtos com ação antimicrobiana. Placa dentária.

Albuquerque YE. Antimicrobial and antibiofilm activity of essential oils against oral microorganisms [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

The objectives of this work were: a) to carry out a critical review of the plants listed in the “*Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS*” (RENISUS) with evidence of antimicrobial activity against cariogenic microorganisms (Publication 1); b) to evaluate and compare antibacterial and anti-adherent activity of essential oils from plants included in RENISUS obtained from two sources (Publication 2); c) to compare the behavior of *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms and to evaluate the cytotoxicity and the ability of essential oils from plants included in RENISUS to interfere on the maturation of these biofilms (Publication 3). Publication 1: Original papers were searched that evaluated plants extracts listed in the RENISUS against cariogenic microorganisms. Only 17 plants of the 71 RENISUS plants were studied. Of the 24 in vitro studies, only 6 carried out tests with biofilms. Only *Lippia sidoides* and *Punica granatum* were evaluated in randomized or cross-over clinical trials. Publication 2: Two samples of essential oils from different sources were obtained from each selected plant species (Marketed source: Empório Laszlo or Quinari; Ex-situ source: Germoplasm bank). Reference microorganisms (*Actinomyces naeslundii* ATCC 19039, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Streptococcus oralis* ATCC 10557, *Streptococcus mutans* ATCC 35688, *Streptococcus parasanguinis* ATCC 903, *Streptococcus salivarius* ATCC 7073 and *Streptococcus mitis* ATCC 9811). For comparison purposes, chlorhexidine digluconate 0.12% (CHX) was used. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of essential oils were determined. The most active essential oils (*Cordia curassavica* and *E. uniflora* from marketed sources and *Eugenia uniflora* and *Tagetes minuta* from ex-situ collection) were evaluated at sub-inhibitory concentrations for their anti-adherent activity and chemically characterized. The essential oils of *C. curassavica* (marketed source) and *T. minuta* (ex-situ source) showed anti-adherent activity against a larger number of reference microorganisms. The major constituents of essential oils are sesquiterpenes. Publication 3: essential oils were evaluated for CIM and CBM of

S. mutans ATCC 35688 and polymicrobial inoculum from human saliva. The most active essential oils were evaluated for the ability to interfere in the maturation of biofilms. Biofilms were analyzed for their acidogenicity, microbiological and biochemical composition. The cytotoxicity of the most active essential oils was evaluated using fibroblasts and keratinocytes cultures. *E. uniflora* essential oil from both sources reduced biofilm viability and acidogenicity and showed cytotoxicity lower or equal to CHX. Polymicrobial biofilms and *S. mutans* biofilms showed different behavior (lower viability, higher acidogenicity and higher concentration of biochemical compounds). General conclusion: few plants listed in RENISUS were evaluated for their anticariogenic potential (Publication 1). The essential oils of *C. curassavica* (marketed source) and *T. minuta* (ex-situ source) showed the best anti-adherence activity. Essential oils obtained from marketed sources can be as effective as oils obtained from ex-situ collections (Publication 2). *E. uniflora* essential oils from both sources were effective in biofilms. Monotypic biofilms may overestimate the antimicrobial action of natural products then being indicated, in vitro studies, the use of polymicrobial biofilms (Publication 3).

Keywords: Medicinal plants. Products with antimicrobial action. Dental plaque.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 PROPOSIÇÃO.....	21
3 PUBLICAÇÕES	22
3.1 Publicação 1	22
3.2 Publicação 2	47
3.3 Publicação 3	79
4 CONCLUSÃO	113
REFERÊNCIA	114
ANEXOS.....	118

1 INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços na medicina ao longo do tempo, ainda há doenças, cuja prevenção e tratamento continuam sendo consideradas um desafio. As doenças orais estão entre as mais presentes no mundo moderno, afetando 3,9 bilhões de pessoas¹, sendo as doenças de origem odontológica (cárie dentária e doença periodontal) as mais prevalentes. Devido a isso, os gastos com a saúde oral podem gerar um grande impacto na economia de um país. De acordo com Righolt et al.² (2018), o impacto econômico mundial causado pelas doenças de origem odontológica foi de US \$ 544,41 bilhões em 2015.

A cárie dentária é uma doença multifatorial, biofilme-açúcar-dependente³, resultante de um desequilíbrio entre os processos de desmineralização e remineralização, decorrente da interação de fatores determinantes (hospedeiro, microbiota cariogênica, dieta rica em carboidratos e tempo)^{4,5} e pela presença de fatores modificadores (fatores sociais, econômicos e comportamentais)⁶.

O biofilme dentário é composto por micro-organismos orais envolvidos em uma matriz rica em polissacarídeos extracelulares sobre uma camada de proteína denominada película adquirida, que é constituída por glicoproteínas salivares, fosfoproteínas, lipídeos e componentes do fluído gengival⁷. Durante a sua formação, há um processo de organização e interação estrutural e metabólica de micro-organismos sobre as superfícies dentárias⁸. Os micro-organismos, atraídos por nutrientes orgânicos acumulados, se aderem a essa película por meio de adesinas presentes na superfície celular bacteriana e criam um ambiente atrativo para a colonização subsequente por outros micro-organismos. Em consequência, polissacarídeos são produzidos e depositados na superfície dentária contribuindo para a formação da matriz extracelular e maturação do biofilme⁷.

A produção da matriz extracelular aumenta a adesão e a coesão dos micro-organismos, causando agregações celulares que proporcionam estabilidade mecânica e dificultam a remoção do biofilme. Ainda, a matriz extracelular modifica as propriedades de difusão, dificultando a penetração de agentes externos⁹.

Em uma situação de equilíbrio, estreptococos não mutans (*S. gordonii*, *S. oralis*, *S. mitis* e *S. anginosus*) e *Actinomyces* spp. são capazes de manter o pH

do biofilme estável, devido ao fato dos ácidos produzidos por essas bactérias serem facilmente neutralizados¹⁰. No entanto, quando açúcares são fornecidos com frequência o ácido produzido não é neutralizado em sua totalidade, o que faz com que estreptococos do grupo mutans e lactobacilos proliferem no biofilme, provocando uma maior produção de ácidos e mantendo o pH baixo, o que resulta no processo de desmineralização do esmalte dentário¹⁰.

A presença do biofilme dentário é considerada o principal fator etiológico local da cárie dentária¹¹ e a sua remoção mecânica associada a redução no consumo de açúcar tem sido indicado para prevenção e controle da doença¹¹⁻¹³. A *American Dental Association* (ADA) recomenda a escovação com uso de dentífrício duas vezes ao dia¹⁴. No entanto, a eficácia da remoção mecânica do biofilme está diretamente relacionada a complacência e a destreza dos indivíduos¹⁵, no qual, muitos não realizam de forma correta por falta de conhecimento ou por problemas motores. Em outras situações, esses cuidados podem não ser suficientes, necessitando de abordagens complementares, como em alguns casos de pacientes portadores de necessidades especiais; pacientes sob tratamento ortodôntico ou com xerostomia^{13,16}. Ainda, de acordo com Valkenburg et al.¹⁵ (2016), o uso de escova dental remove apenas 49% do biofilme presente e a associação com um dentífrício não fornece um efeito adicional para a remoção mecânica do biofilme.

Outro meio indicado em prol da prevenção e do controle da cárie dentária é o uso de fluoretos. Apesar de seu uso ter se mostrado eficaz, não oferece proteção completa contra o desenvolvimento da cárie dentária¹⁷. Assim, o uso de substâncias antimicrobianas pode auxiliar na prevenção e no controle da cárie dentária em situações específicas.

Diversos antimicrobianos podem ser encontrados no mercado, como produtos contendo cloreto de cetilperidínio, triclosan, clorexidina, entre outros. A clorexidina é a substância que mais se destaca, sendo muito utilizada na Odontologia para o tratamento de pacientes e em estudos científicos clínicos e laboratoriais como controle positivo^{18,19}. Apresenta amplo espectro de ação, atividade bactericida em concentrações mais elevadas, atividade bacteriostática em concentrações mais baixas²⁰ e eficácia no controle da microbiota salivar^{21,22}. Entretanto, apresenta ação diminuída em biofilmes maduros^{9,23,24}, relatos da ocorrência de efeitos citotóxico e de danos ao material genético²⁵⁻²⁷. Ainda,

quando utilizada por períodos prolongados, causa manchamento dos dentes, sensação de queimação, alterações do paladar, irritação, dor e descamação da mucosa²⁸.

De acordo com Liu et al.⁹ (2018), os antimicrobianos convencionais de amplo espectro só podem ajudar a manter os níveis microbianos compatíveis com uma situação de equilíbrio, sendo ineficazes quando as condições favorecem o desenvolvimento de lesões de cárie, devido à sua incapacidade de degradar a matriz extracelular dos biofilmes e eliminar os micro-organismos presentes no biofilme ou de afetar os aspectos físico-químicos da cárie dentária. Portanto, necessita-se de novos agentes antimicrobianos eficazes que não causem efeitos citotóxico ou colaterais aos tecidos circundantes.

O uso de produtos naturais como opção de tratamento é descrito desde as antigas civilizações²⁹, devido a necessidade de algo que pudesse proporcionar alívio da dor e cura de doenças³⁰. O estudo dos produtos naturais exerceu um papel primordial para o desenvolvimento da química medicinal moderna, servindo como ponto de partida para a descoberta de compostos e desenvolvimento de fármacos para o tratamento e cura de doenças³⁰.

As plantas medicinais são importantes fontes de compostos bioativos, devido à produção de diversos metabólitos secundários com efeitos biológicos, como atividade antimicrobiana e antiaderente³¹. Óleos essenciais são substâncias lipofílicas, odoríferas e voláteis, que têm sido cada vez mais utilizados na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia como uma alternativa aos produtos sintéticos (Montanari³², 2010). Os óleos essenciais podem ser extraídos através de diversas técnicas, sendo o arraste a vapor e a hidrodestilação as mais utilizadas. Apesar dessas técnicas apresentarem o mesmo princípio, elas apresentam algumas diferenças. Na técnica de arraste a vapor, o material vegetal não entra em contato com água, ao contrário do que ocorre na hidrodestilação. Ainda, a técnica de arraste a vapor consome pouca energia e tempo, o aparato é simples e de baixo custo (Bezerra et al.³³, 2010), sendo muito utilizado para a produção de óleos essenciais para fins comerciais.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) tem relatado a importância do uso de plantas medicinais como recurso terapêutico desde 1978 e tem recomendado a difusão mundial dos conhecimentos necessários para o seu uso³⁴. O Brasil apresenta uma grande biodiversidade de plantas em seu

território. No entanto, o seu potencial para o desenvolvimento de Fitoterápicos só foi reconhecido pelo Governo Federal em 2006, por meio da criação da “Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterapia”³⁵. Essa política tem o objetivo de fomentar pesquisas, desenvolvimento tecnológico e inovação na área de produtos naturais e atender as necessidades epidemiológicas do país³⁶. Esse Decreto resultou na criação, em 2009, da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), que apresenta uma lista de 71 plantas com potencial para gerar produtos de interesse para a rede pública de saúde³⁷. Apesar da criação dessas políticas, na Odontologia, os estudos com plantas medicinais têm se demonstrado escassos no país³⁸. Ainda, a maioria dos trabalhos disponíveis na literatura apresentam limitações metodológicas, como uso de metodologias em estudos *in vitro* que não mimetizam as condições da cavidade bucal e com a seleção de voluntários para estudos clínicos que não apresentam características próximas às da população de interesse, podendo gerar implicações diretas no desenvolvimento de novos produtos odontológicos eficazes.

É importante saber quais plantas da RENISUS apresentam algum potencial anticariogênico ou que ainda não foram estudadas e também analisar os tipos de estudos e metodologias empregadas nos trabalhos realizados até o momento. Essas informações podem servir de guia para o desenvolvimento de novos trabalhos e produtos odontológicos. Portanto, o objetivo desse trabalho foi realizar uma revisão crítica sobre as plantas listadas na RENISUS que apresentam evidência de atividade antimicrobiana contra micro-organismos cariogênicos (Publicação 1), avaliar a atividade antimicrobiana e antiaderente de óleos essenciais em bactérias cariogênicas (Publicação 2) e os diferentes comportamentos de biofilmes de *S. mutans* e polimicrobianos quando tratados com os óleos essenciais (Publicação 3).

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo desse trabalho foi: a) realizar uma revisão crítica sobre as plantas listadas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) que apresentam evidência de atividade antimicrobiana contra micro-organismos cariogênicos; b): avaliar e comparar a atividade antibacteriana e anti-aderente de óleos essenciais de plantas incluídas na RENISUS obtidos de duas fontes; c) comparar o comportamento de biofilmes monotípicos de *S. mutans* com biofilmes polimicrobianos e avaliar a citotoxicidade e a capacidade de óleos essenciais de plantas incluídas na RENISUS em interferir na maturação desses biofilmes.

3 PUBLICAÇÕES

3.1 Publicação 1

Potencial anticariogênico de plantas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – uma revisão crítica*

Albuquerque YE¹, Rosselli ER², Brighenti FL¹

¹Departamento de Clínica infantil, Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), campus de Araraquara, Araraquara, SP, Brasil

²Departamento de Clínica e Cirurgia, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brasil.

Autor correspondente:

Fernanda Lourenção Brighenti

Rua Humaitá, 1680 – Centro

Araraquara – SP

CEP: 14801 – 903

Tel: +55 (16) 33016551

E-mail: fbrighenti@foar.unesp.br

*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

Resumo

O objetivo do trabalho foi realizar uma revisão crítica sobre o potencial anticariogênico das plantas medicinais listadas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Foram utilizados descritores pré-selecionados para as buscas nas bases de dados PubMed e Google Acadêmico de artigos originais que avaliaram extratos de plantas listadas na RENISUS contra micro-organismos cariogênicos. Os dados dos 30 artigos selecionados foram apresentados de acordo com o tipo de estudo e o método aplicado. Apenas 17 das 71 plantas listadas na RENISUS foram estudadas. Dos 24 estudos in vitro, apenas 6 realizaram testes com biofilmes. Apenas *Lippia sidoides* e *Punica granatum* foram avaliadas em estudos clínicos randomizados ou cruzados. A maioria dos estudos apresentaram resultados promissores, entretanto as análises realizadas são preliminares. Pode-se concluir que poucas plantas listadas na RENISUS foram avaliadas quanto ao seu potencial anticariogênico. Há a necessidade de estudos in vitro com avaliações mais completas que possam mimetizar as condições da cavidade bucal e de estudos clínicos randomizados que utilizem participantes com alto risco à cárie dentária, o que poderia ter implicações diretas no desenvolvimento de produtos odontológicos antimicrobianos e antibiofilmes eficazes.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Cárie dentária.

Introdução

As doenças orais ainda constituem um grande problema de saúde pública, afetando 3,47 bilhões de pessoas no mundo, de acordo com dados publicados em 2018¹. Dentre elas, destaca-se a cárie dentária, doença que afeta 60-90% das crianças em idade escolar e grande parte dos adultos². Quando não tratada, a cárie dentária pode causar dor, infecções e perda dos dentes³ que, por sua vez, podem interferir na saúde geral e na qualidade de vida da população afetada^{4,5}.

O uso de substâncias antimicrobianas tem sido indicado nos casos em que o controle mecânico do biofilme e o uso de fluoretos não são capazes de controlar a doença cárie^{6,7}. Entretanto, a eficácia e segurança das substâncias disponíveis no mercado têm sido questionadas. A clorexidina é uma substância muito utilizada na Odontologia por possuir ação no controle da microbiota salivar^{8,9}. Contudo, quando utilizada por períodos prolongados, causa efeitos colaterais, como manchamento dos dentes, descamação da mucosa, alterações do paladar, sensação de queimação e aumento dos calcificados supragengivais^{10,11}. Ainda, alguns autores relataram dificuldade de sua ação em biofilmes maduros^{12,13}, a ocorrência de efeito citotóxico e de danos ao material genético¹⁴⁻¹⁶.

Outra substância utilizada é o cloreto de cetilpiridínio, que apresenta eficácia no controle da formação do biofilme dentário¹⁷⁻¹⁹. Contudo, seu efeito terapêutico é de apenas 90 min²⁰ e também causa ulcerações, coloração da língua, manchas nos dentes, sensação de ardência e alteração do paladar quando utilizado em altas concentrações²¹. O triclosan possui propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias²². No entanto, seu potencial de ação só apresenta maior eficácia quando associado a outros agentes devido a sua baixa substantividade²³⁻²⁵ e, de acordo com Neumegen et al.²⁶(2005), possui efeito citotóxico.

O uso de plantas medicinais como opção de tratamento para diversas doenças é descrito desde os tempos das antigas civilizações²⁷ e, atualmente, tem sido cada vez mais utilizado em diversas regiões do mundo.

As plantas medicinais produzem uma variedade de substâncias com propriedades antimicrobianas. Portanto, é esperado que várias áreas da saúde desenvolvam projetos de pesquisa com o objetivo de identificar essas

substâncias e desenvolver novos produtos. Na odontologia, as pesquisas com produtos naturais têm aumentado nos últimos anos devido à busca por novos produtos efetivos, com menor toxicidade e menor custo²⁸.

Desde 1978, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem destacado a importância da valorização do uso de plantas medicinais como recursos terapêuticos e tem recomendado a difusão mundial dos conhecimentos necessários para o seu uso²⁹. O Brasil apresenta uma grande biodiversidade de plantas medicinais com potencial para o desenvolvimento de fitoterápicos. Esse potencial foi reconhecido pelo Governo Federal em 2006, por meio da criação da “Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterapia”³⁰. Essa política possui o objetivo de fomentar pesquisa, incentivar o desenvolvimento tecnológico e inovar na área de produtos naturais para atender às necessidades epidemiológicas do país. Esse Decreto resultou na criação, em 2009, da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), que traz uma lista de 71 plantas com potencial para gerar produtos de interesse para a rede pública de saúde³¹.

O objetivo desse trabalho foi realizar uma revisão crítica sobre as plantas listadas na RENISUS que apresentam evidência de atividade antimicrobiana contra micro-organismos cariogênicos e analisar as metodologias empregadas. Essa revisão poderá servir de guia para o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas no futuro.

Materiais e Métodos

A lista completa das plantas constantes da RENISUS foi obtida no site do Ministério da Saúde³¹. Para o desenvolvimento dessa revisão crítica, foram utilizadas as bases mais utilizadas para a buscas de artigos científicos em inglês e em português, Pubmed e Google Acadêmico, durante o período de julho a agosto de 2016. Foi realizada uma busca de artigos científicos publicados até 2016 que avaliaram plantas medicinais listadas na RENISUS quanto ao seu potencial anticariogênico. Os dados foram coletados por um único pesquisador. Os critérios de inclusão adotados para a seleção inicial dos artigos foram os seguintes: a) Artigos completos de pesquisa científica, b) Estudos do extrato bruto de plantas incluídas na RENISUS, c) Apresentar informações sobre partes das plantas, tipos e concentrações dos extratos utilizados, d) Utilização de

espécies cariogênicas, e) Estudos in vitro que avaliaram as concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos extratos das plantas. Os critérios de exclusão adotados para a seleção dos trabalhos foram os seguintes: a) uso de somente compostos isolados das plantas ou frações, b) combinação com plantas que não estão listadas na RENISUS. Em seguida, para complementar as informações sobre o estado da arte das espécies contidas na RENISUS, também foram pesquisados trabalhos que atendiam aos seguintes critérios de inclusão: a) Estudos in vitro que utilizaram biofilmes e espécies cariogênicas e b) Estudos clínicos randomizados ou cruzados que avaliaram o potencial anticariogênico.

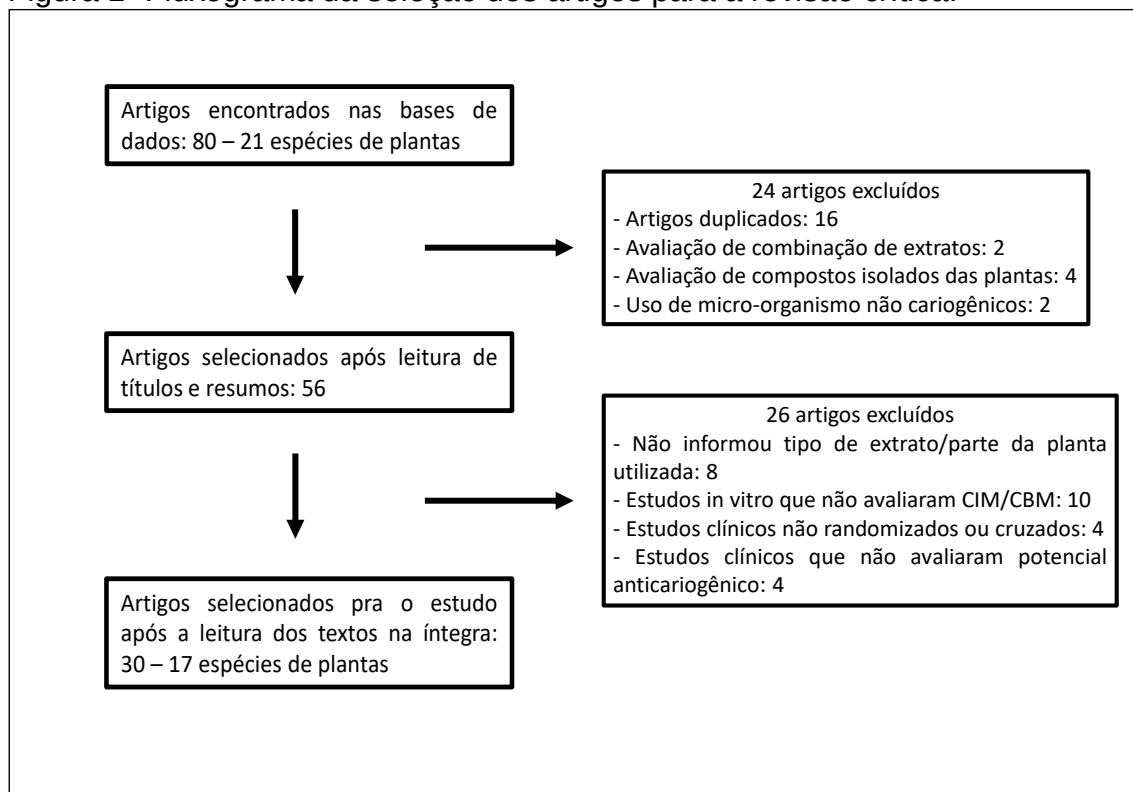
Os descritores em inglês utilizados nas duas bases de dados foram selecionados com o auxílio da ferramenta “Mesh” da base de dados PubMed. A estratégia de busca utilizada nas duas bases foram: nome científico ou nome popular da planta AND “*microbial sensitivity tests*” AND “*dental caries*”; nome científico ou nome popular da planta AND “*microbial sensitivity tests*” AND “*dental biofilms*”; nome científico ou nome popular da planta AND “*microbial sensitivity tests*” AND “*oral microorganisms*”; nome científico ou nome popular da planta AND “*microbial sensitivity tests*” AND “*oral bacteria*” e nome científico ou nome popular da planta AND “*clinical trial*”. Os descritores em português utilizados na base de dados Google acadêmico foram selecionados através da consulta ao DeCS (Descritores em Ciências da Saúde). A estratégia de busca utilizada foi: nome científico ou nome popular da planta E “testes de sensibilidade antimicrobiana” E “cárie dentária”. O nome científico aceito das espécies e seus sinônimos foram verificados na base de dados “Catalogue of Life”.

Os artigos selecionados foram agrupados em uma tabela do software Microsoft Excel 2013 de acordo com a espécie da planta estudada. As variáveis avaliadas nos estudos in vitro foram: planta estudada, parte da planta utilizada, tipo de extrato, micro-organismo(s) testado(s) e concentração inibitória mínima (CIM). As variáveis avaliadas nos estudos in vitro realizados em biofilmes foram: planta estudada, tipo de avaliação, metodologia e resultados. As variáveis avaliadas nos estudos clínicos foram: planta estudada, parte da planta utilizada, tipo de produto formulado e testado, delineamento experimental, participantes e resultados.

Resultados

Das 71 plantas listadas na RENISUS, 21 (29,5%) espécies possuíam trabalhos (80 artigos) nas bases de dados. Após a leitura dos resumos, foram selecionados 56 artigos. Após, a leitura dos artigos na íntegra, 26 trabalhos foram eliminados de acordo com os critérios de exclusão e 30 trabalhos referentes a 17 (24%) das 71 espécies de plantas foram selecionados para este estudo (Figura 1).

Figura 1- Fluxograma da seleção dos artigos para a revisão crítica.



Fonte: Elaboração própria.

As plantas listadas na RENISUS mais frequentemente estudadas foram *Lippia sidoides* (alecrim pimenta) (7 artigos, 23,3%), *Allium sativum* (alho) (5 artigos, 16,6%) e *Anacardium occidentale* (cajueiro) (5 artigos, 16,6%).

A maioria dos estudos selecionados é de origem brasileira (63%) e foram publicados no período de 2011 a 2014 (60%) em inglês (83%). A obtenção de óleos essenciais foi o método de extração mais frequentemente utilizado (26,6%), seguido pela obtenção de extratos aquosos (23,3%) e hidroalcoólicos (23,3%). A parte das plantas mais frequentemente utilizada foram as folhas (36,6%). Também foram encontrados estudos que utilizaram casca, caules,

fruto, pedúnculo, partes aéreas, flores, inflorescência, rebento e rizoma. A maioria dos artigos encontrados foram estudos in vitro (Quadros 1, 2 e 3). Dos 24 estudos in vitro que avaliaram a CIM, apenas seis também avaliaram micro-organismos em biofilme (Quadro 2). Não foram encontrados estudos in situ e apenas seis artigos dos 30 selecionados são de estudos clínicos randomizados ou cruzados.

Nos testes in vitro que avaliaram a CIM, os micro-organismos mais frequentemente utilizados foram os *Streptococcus* spp. (100%), seguidos dos *Lactobacillus* spp. (20,8%) e *Actinomyces* spp. (16,6%) (Quadro 1). A metodologia mais frequentemente utilizada foi a técnica de diluição em caldo (83,3%), seguida pelos métodos de difusão em ágar (29,1%) e difusão em disco (20,8%). Esses métodos são preconizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*³²⁻³⁴. O digluconato de clorexidina 0,12% (CHX) foi a substância mais frequentemente utilizada como controle positivo (41,6%).

Os resultados da CIM variaram de 4 µg/mL a 250 mg/mL. Os menores resultados de CIM foram obtidos pelos testes realizados com *Allium sativum*³⁵, *Aloe* spp.³⁶, *Achillea millefolium*³⁷ (Kermanshah et al., 2014) e *Eucalyptus globulus*³⁸.

Todos os estudos in vitro com biofilmes utilizaram *Streptococcus* spp. Não foram realizados testes com biofilmes de *Lactobacillus* spp. e *Actinomyces* spp. Apenas um estudo utilizou biofilme multiespécie (*C. albicans*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. oralis* e *L. casei*). A técnica de avaliação mais frequentemente utilizada foi a quantificação da biomassa dos biofilmes formados, utilizando a metodologia do cristal violeta (Quadro 2). Apesar de a maioria dos estudos terem apresentado resultados promissores, apenas duas plantas foram avaliadas em estudos clínicos randomizados ou cruzados. Esses estudos demonstraram que *Lippia sidoides* e *Punica granatum* podem ser úteis no tratamento e na prevenção da cárie dentária (Quadro 3).

Quadro 1- Estudos in vitro que avaliaram a concentração inibitória mínima (CIM) das plantas medicinais listadas na RENISUS (Continua)

Nome científico	Referência (País)	Parte da planta estudada	Tipo de extrato	Espécies bacterianas testadas	CIM (mg/mL)
<i>Achillea millefolium</i>	Cecchini et al. ⁴⁰ , 2012 (Itália)	Inflorescência, flores e partes aéreas	óleo essencial	<i>S. mutans</i> , <i>L. acidophilus</i> e <i>S. salivarius</i>	0,038 – 2,5 mg/mL*
	Kermanshah et al. ³⁷ , 2014 (Irã)	rebento	Hidroalcoólico	<i>S. mutans</i> , <i>L. rhamnosus</i> e <i>A. viscosus</i>	0,0125 – 0,05 mg/mL*
<i>Allium sativum</i>	Bakri et al. ⁶⁷ , 2005 (Reino Unido)	cabeça de alho	aquoso	<i>S. mutans</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. parasanguis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. crista</i> , <i>S. oralis</i> , <i>A. naeslundii</i>	71,4 – 142,7 mg/mL
	Groppa et al. ⁶⁹ , 2007 (Brasil)	Cabeça de alho	aquoso	<i>S. sobrinus</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. sanguis</i> e saliva	0,5 – 64 mg/mL
	Fani et al. ³⁵ , 2007 (Irã)	cabeça de alho	aquoso	<i>S. mutans</i>	0,004-0,032 mg/mL*
	Owhe-Ureghe et al., 2010 ⁷³ (Nigéria)	cabeça de alho	aquoso	<i>S. mutans</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>A. viscosus</i>	31,25 – 62,50 mg/mL
	Lee et al. ⁷⁴ , 2011 (Coreia do Sul)	cabeça de alho	extração sob pressão	<i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>S. gordonii</i>	32 – 128 mg/mL
<i>Aloe spp.</i>	Fani e Kohanteb ³⁶ , 2012 (Irã)	folhas	mucilagem	<i>S. mutans</i>	0,0125 – 0,025 mg/mL*
<i>Anacardium occidentale</i>	Araújo et al. ⁷⁵ , 2009 (Brasil)	casca do caule	hidroalcoólico	<i>S. mutans</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. sobrinus</i> e <i>L. casei</i>	1:4 – 1:8 p/v**
	Melo et al. ⁴¹ , 2006 (Brasil)	casca do caule	hexânico, acetônico, metanólico e aquoso	<i>S. mitis</i> , <i>S. mutans</i> e <i>S. sanguis</i>	6,25 – 12,5 mg/mL
	Furtado et al. ⁵⁹ , 2014 (Brasil)	Bagaço do pedúnculo	etanólico	<i>S. mutans</i>	0,5 µg/mL*
	Barad et al. ⁷⁰ , 2014 (Índia)	folhas	hexânico, acetônico, metanólico, e aquoso.	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> e <i>S. mutans</i>	0,062 – 0,5 mg/mL*
	Anand et al. ⁶⁸ , 2015 (Índia)	folhas	etanólico	<i>S. mutans</i>	0,078 mg/mL*

Quadro 1- Estudos in vitro que avaliaram a concentração inibitória mínima (CIM) das plantas medicinais listadas na RENISUS (Continuação)

<i>Apuleia ferrea</i>	Sampaio et al. ⁴² , 2009 (Brasil)	fruto	metanólico	<i>S. mutans</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. oralis</i> e <i>L. casei</i> .	0,04 – 0,1 mg/mL*
<i>Bauhinia fortificata</i>	Rocha et al. ⁷⁶ , 2013 (Brasil)	casca do caule	hidroalcoólico	<i>S. mutans</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. oralis</i> e <i>S. parasanguinis</i> .	12,5% - 50%**
<i>Copaífera</i> spp.	Vasconcelos et al. ⁷⁷ , 2008 (Brasil)	tronco	óleo-resina	<i>S. mutans</i> e <i>S. sanguinis</i>	1:1 – 1:32 p/v**
<i>Eucalyptus globulus</i>	Goldback et al. ³⁸ , 2014 (Brasil)	partes aéreas	óleo essencial	<i>S. mutans</i>	0,013 mg/mL;
	Barad et al. ⁷⁰ , 2014 (Índia)	folhas	hexânico, acetônico, metanólico e aquoso	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>S. mutans</i>	0,025 – 0,25 mg/mL*
<i>Eugenia uniflora</i>	Bersan et al. ⁴³ , 2014 (Brasil)	folhas	óleo essencial	<i>S. sanguis</i> e <i>S. mitis</i>	0,5 mg/mL
<i>Lippia sidoides</i>	Botelho et al. ⁴⁷ , 2007 (Brasil)	folhas	óleo essencial	<i>S. mutans</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. sanguis</i> e <i>S. salivarius</i>	5 – 10 mg/mL
	Bersan et al. ⁴³ , 2014 (Brasil)	folhas	óleo essencial	<i>S. sanguis</i> e <i>S. mitis</i>	0,125 – 250 mg/mL
<i>Menta piperita</i>	Bersan et al. ⁴³ , 2014 (Brasil)	folhas	óleo essencial	<i>S. sanguis</i> e <i>S. mitis</i>	0,5 mg/mL
<i>Mikania</i> spp.	Yatsuda et al. ⁷⁸ , 2005 (Brasil)	partes aéreas	hidroalcoólico	<i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i> e <i>S. cricetus</i>	0,025 - >0,8 mg/mL*
	Bersan et al. ⁴³ , 2014 (Brasil)	folhas	óleo essencial	<i>S. sanguis</i> e <i>S. mitis</i>	0,062 – 0,125 mg/mL
<i>Psidium guajava</i>	Vieira et al. ⁴⁵ , 2014 (Brasil)	folhas	hidroalcoólico	<i>S. mutans</i>	5 – 100 mg/mL
<i>Punica granatum</i>	Barad et al. ⁷⁰ , 2014 (Índia)	folhas	hexânico, acetônico, metanólico e aquoso	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>S. mutans</i>	0,2 mg/mL*
	Vieira et al. ⁴⁵ , 2014 (Brasil)	folhas	hidroalcoólico	<i>S. mutans</i>	5 – 100 mg/mL

Quadro 1- Estudos in vitro que avaliaram a concentração inibitória mínima (CIM) das plantas medicinais listadas na RENISUS (Conclusão)

<i>Schinus terebinthifolius</i>	Vieira et al. ⁴⁵ , 2014 (Brasil)	casca	hidroalcoólico	<i>S. mutans</i>	5 – 100 mg/mL
	Pereira et al. ⁷⁹ , 2011 (Brasil)	folhas e casca do caule	etanólico, hexânico e butanólico	<i>S. mutans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i>	3,25 mg/mL
	Rocha et al. ⁷⁶ , 2013 (Brasil)	casca e folhas	hidroalcoólico	<i>S. mutans</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. oralis</i> e <i>S. parasanguinis</i> .	12,5 – 50%**
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	Pereira et al. ⁷⁹ , 2011 (Brasil)	folhas e casca do caule	etanólico, hexânico e butanólico	<i>S. mutans</i>	1 mg/mL
<i>Zingiber officinale</i>	Giriraju e Yunus ⁴⁶ , 2013 (Índia)	rizoma	etanólico	<i>S. mutans</i>	1,25 – 10%**
	Azizi et al. ⁸⁰ , 2015 (Irã)	rizoma	etanólico	<i>Streptococcus mutans</i> e <i>S. sanguinis</i>	0,02 – 0,3 mg/mL

*Valores convertidos para mg/mL. **Valores que não foram possíveis de serem convertidos em mg/mL.

Fonte: Elaboração própria.

Quadro 2- Estudos in vitro que utilizaram biofilmes para avaliar o potencial anticariogênico das plantas medicinais listadas na RENISUS

Nome científico	Referência (País)	Tipo de avaliação	Metodologia	Resultados
<i>Allium sativum</i>	Lee et al. ⁷⁴ , 2011 (Coréia do Sul)	Efeito do extrato de alho (4-16 mg/mL, por 40 h) na formação de biofilmes de <i>S. mutans</i> e <i>S. sobrinus</i> na superfície do fio ortodôntico.	Ensaio de luminescência de ATP, contagem de células viáveis.	O extrato aumentou proporcionalmente a formação de biofilmes na superfície do fio ortodôntico.
<i>Anacardium occidentale</i>	Furtado et al. ⁵⁹ , 2014 (Brasil)	Efeito do extrato (15,6 - 500 µg/mL, por 24 h) na formação de biofilmes de <i>S. mutans</i> em placas de 96 poços.	Teste de microtitulação e quantificação da biomassa.	O extrato na concentração igual ou superior a 250 µg/mL inibiu o crescimento dos biofilmes.
	Anand et al. ⁶⁸ , 2015 (Índia)	O efeito do extrato (200 µg/mL, por 4 h) na supressão de biofilmes pré-formados de <i>S. mutans</i> em placas de 96 poços.	Teste de microtitulação e quantificação da biomassa.	O extrato foi capaz de inibir biofilmes de <i>S. mutans</i> .
<i>Apuleia ferrea</i>	Sampaio et al. ⁴² , 2009 (Brasil)	O efeito do extrato (1:1, por 64,5 h) em biofilmes multiespécie formados em blocos de esmalte de dentes bovinos.	Modelo de biofilme multiespécie (<i>C. albicans</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. oralis</i> e <i>L. casei</i>).	O extrato possui atividade antimicrobiana sobre a formação de biofilmes, porém esta é menor quando comparada a da clorexidina.
<i>Eucalyptus globulus</i>	Goldback et al. ³⁸ , 2014 (Brasil)	Capacidade do óleo essencial (2 mg/mL, por 48 h) em impedir a formação de biofilme de <i>S. mutans</i> em placas de 96 poços.	Quantificação da biomassa.	O óleo foi capaz de inibir a formação de biofilmes.
<i>Lippia sidoides</i>	Bersan et al. ⁴³ , 2014 (Brasil)	Efeito do óleo essencial (1 mg/mL por 36 h) nos biofilmes de <i>S. sanguis</i> e <i>S. mitis</i> formados em placas de 96 poços.	Quantificação da biomassa.	O óleo foi capaz de inibir 58,13% do biofilme de <i>S. sanguis</i> e 5,5% do biofilme de <i>S. mitis</i> .

Fonte: Elaboração própria.

Quadro 3- Estudos clínicos randomizados ou cruzados que avaliaram o potencial anticariogênico das plantas medicinais listadas na RENISUS

Nome científico	Autores (País)	Parte usada	Tipo de produto	Design experimental	Participantes / idade	Duração / frequência	Resultados
<i>Lippia sidoides</i>	Nunes et al. ⁸¹ , 2006 (Brasil)	partes aéreas	creme dental e enxaguatório à base de extrato hidroalcoólico	randomizado, cego	84 homens (18 a 45 anos) com índice de placa $\geq 50\%$	28 dias, 3X/dia	Redução no índice de placa
	Botelho et al. ⁴⁴ , 2007 (Brasil)	folhas	Enxaguatório com 1% de óleo essencial	randomizado, duplo cego	55 pacientes (18 a 69 anos)	7 dias, 2X / dia por 30 s	Redução nos índices salivares de <i>S. mutans</i> e de placa
	Lobo et al. ⁸² , 2011 (Brasil)	folhas	géis e enxaguatórios contendo 0,8%, 1%, 1,2% e 1,4% de óleo essencial	randomizado	37 crianças com cárie dentária (6 a 12 anos)	Aplicação única; enxaguatório por 1 min e aplicação do gel por 4 min	Redução nos níveis de <i>S. mutans</i>
	Rodrigues et al. ⁸³ , 2013 (Brasil)	folhas	Enxaguatório contendo 10% de óleo essencial	cruzado, duplo-cego	10 estudantes (19-23 anos)	Três fases experimentais de 3 dias; 2X/dia por 60 s	Redução no índice de placa
	Lobo et al. ⁸⁴ , 2014 (Brasil)	folhas	Creme dental, gel e enxaguatório bucal contendo, 1,4%, 1,4% e 0,8% de óleo essencial	randomizado, duplo cego	81 crianças com cárie (6 a 12 anos)	5 dias; 1X/dia por 1 min	Redução nos níveis salivares de <i>S. mutans</i>
<i>Punica granatum</i>	Menezes et al. ⁸⁵ , 2006 (Brasil)	fruto	Enxaguatório contendo extrato hidroalcoólico	randomizado	60 pessoas usuárias de aparelho ortodôntico, (9-25 anos)	Aplicação única por 1 min	Redução nos níveis de micro-organismos totais da placa dentária

Fonte: Elaboração própria.

Discussão

Ao analisar os resultados encontrados neste estudo, observa-se que as plantas listadas na RENISUS que foram avaliadas até o momento apresentam potencial anticariogênico. O fato da maioria dos trabalhos com essas plantas terem sido realizados no Brasil e publicados entre 2011 a 2014 sugere que após a criação da RENISUS, em 2009, houve maior interesse na realização de pesquisas científicas com essas espécies. No entanto, 76% das espécies incluídas na RENISUS ainda não foram objeto de estudo quanto às suas propriedades anticariogênicas.

Algumas considerações importantes sobre as metodologias utilizadas pelos trabalhos selecionados devem ser realizadas. Os estudos *in vitro* que avaliaram a CIM encontraram como desfecho a inibição dos micro-organismos cariogênicos através dos métodos de diluição em caldo, difusão em disco e/ou difusão em ágar, que são metodologias bem aceitas e padronizadas³²⁻³⁴. Contudo, não é possível classificar, através apenas da avaliação dos resultados de CIM se os extratos possuíam boa atividade antimicrobiana, pois até o momento não foram estabelecidos critérios validados para essa metodologia³⁹. Por esse motivo, os valores encontrados de CIM devem ser utilizados apenas como ponto de partida para a realização de outros estudos.

Ainda, os valores da CIM não devem ser analisados isoladamente. Outro aspecto importante a ser considerado é o rendimento em massa do extrato³⁹. Dois extratos que apresentam um mesmo valor de CIM, mas diferentes rendimentos em massa acabam tendo diferenças quanto à viabilidade de incorporação em produtos para uso oral. Um rendimento muito baixo pode inviabilizar a produção em larga escala, pois o custo do produto irá aumentar devido à necessidade de cultivo de grande quantidade de plantas para atender a demanda. Apesar da importância do rendimento em massa nos estudos de extratos vegetais, apenas 9 estudos incluídos no presente trabalho apresentaram essa informação^{38,40-47}.

Outras informações e padronizações também são essenciais, como: parte da planta utilizada, tipo solvente empregado para a obtenção do extrato, concentração do extrato estudado, modo de cultivo e concentração dos micro-organismos, tempo de exposição dos micro-organismos às substâncias testadas, forma de incubação e meio de cultura utilizado. No total, oito artigos⁴⁸⁻⁵⁵ foram excluídos desse estudo devido à falta de algumas dessas informações. O uso de metodologias padronizadas,

bem como a sua descrição de forma clara nos trabalhos são necessários com o intuito de reduzir a ocorrência de desvios nos resultados e vieses metodológicos^{55,56}.

A maioria dos estudos realizou os testes nos micro-organismos em meio líquido. Na cavidade oral, os micro-organismos se aderem à superfície dentária e formam um ecossistema extremamente complexo composto por um biofilme estruturado envolvido por uma matriz extracelular. A estrutura física e a composição da matriz extracelular dos biofilmes formam uma barreira que dificulta a penetração de agentes antimicrobianos⁵⁷⁻⁵⁹. Apesar da maior resistência a substâncias antimicrobianas quando os micro-organismos estão organizados em biofilmes, os trabalhos utilizando esse tipo de crescimento microbiano são escassos. Portanto, é muito importante que estudos sejam realizados também em biofilmes, utilizando metodologias que possam mimetizar *in vitro*, de forma mais parecida possível, o que ocorre na cavidade bucal.

Ainda, a maioria dos estudos *in vitro* incluídos na presente revisão não levaram em consideração as interações microbianas que ocorrem na cavidade bucal e estudaram somente espécies isoladas. Existem em torno de 700 espécies de micro-organismos convivendo em comunidade no meio bucal⁶⁰. As interações entre os micro-organismos alteram seus metabolismos e comportamentos, tornando-os mais resistentes a antimicrobianos⁶¹. De acordo com Palmer et al.⁶² (2010), é necessária uma concentração de 10 a 100 vezes maior de uma substância antimicrobiana para controlar um biofilme com composição diversificada de micro-organismos do que com micro-organismos em suspensão. Portanto, a avaliação da atividade antimicrobiana utilizando biofilmes multiespécies também é importante e deveria ser adotada de rotina para avaliação de substâncias para prevenção da cárie dentária.

Os estudos *in vitro* realizados com biofilmes estabeleceram como desfecho a inibição ou não da formação dos biofilmes, avaliando, na maioria dos trabalhos, somente a quantificação da biomassa dos biofilmes formados. Contudo, para a obtenção de resultados mais concretos é necessário realizar estudos mais completos, como a avaliação da capacidade dos extratos de impedir a adesão de micro-organismos e a formação de biofilmes e a capacidade de atuar em biofilmes pré-formados. Ainda, sabe-se que 40% do peso seco do biofilme dentário é composto por polissacarídeos, cuja produção está relacionada com a virulência dos biofilmes⁶³, e que a capacidade de inibir o crescimento de micro-organismos cariogênicos não é o único caminho a ser explorado na tentativa de reduzir o desenvolvimento da cárie

dentária⁶⁴⁻⁶⁵. Portanto, a capacidade de inibição da síntese de polissacarídeos extracelulares também é uma estratégia que pode ser explorada. Essas avaliações podem ser realizadas através da quantificação de polissacarídeos presentes na matriz extracelular dos biofilmes formados e, ainda avaliar a influência dos extratos na expressão dos genes responsáveis pela síntese de polissacarídeos dos micro-organismos.

Os estudos clínicos randomizados são denominados como uma das ferramentas mais poderosas para a obtenção de evidências para a prática clínica.⁶⁶ Os estudos clínicos avaliados apresentaram resultados promissores com o uso de produtos à base de *Lippia sidoides* e de *Punica granatum*. Contudo, uma limitação desses estudos é que não utilizaram voluntários que apresentavam alto risco para desenvolvimento de cárie dentária. Por ser importante que a avaliação clínica da eficácia dos produtos utilize voluntários com condições mais próximas da população que irá utilizá-los futuramente, é desejável a realização de trabalhos clínicos randomizados com uma população de alto risco para o desenvolvimento de cárie dentária.

Poucos trabalhos realizaram análises complementares, como curva de morte⁶⁷, avaliação da citotoxicidade⁶⁸ e caracterização química dos extratos estudados^{37,41,42,69,70}. Testes de curvas de morte fornecem informações sobre o perfil de atividade antimicrobiana ao longo do tempo, podendo ser úteis para detectar subpopulações tolerantes aos extratos avaliados⁷¹. Já os testes de citotoxicidade sob células hospedeiras avaliam a seletividade da atividade farmacológica dos extratos⁷². A identificação e a quantificação dos componentes dos extratos vegetais permitem um melhor entendimento das suas atividades farmacológicas. Portanto, é recomendado que esses testes sejam realizados em paralelo.

As informações apresentadas por esse trabalho mostram a necessidade de explorar melhor o potencial das plantas listadas na RENISUS, pois muitas plantas ainda não foram estudadas. Além disso, apenas um estudo in vitro avaliou o potencial de uma planta em biofilmes multiespécies e há poucos estudos clínicos disponíveis. Os resultados obtidos podem ser úteis para o desenvolvimento de projetos de pesquisa que visam a elaboração de produtos eficazes na prevenção e no tratamento da cárie dentária.

Conclusão

Apenas uma pequena parte das plantas listadas na RENISUS foi avaliada quanto ao seu potencial anticariogênico (24%). As espécies mais frequentemente estudadas foram *Lippia sidoides* (23,3%), *Allium sativum* (16,6%) e *Anacardium occidentale* (16,6%). Apenas *Lippia sidoides* e *Punica granatum* foram avaliados em estudos clínicos randomizados ou cruzados. Há a necessidade da realização de estudos in vitro bem delineados (avaliações mais completas, utilizando metodologias que possam mimetizar as condições da cavidade bucal) e de estudos clínicos randomizados que utilizem participantes com características próximas às da população de interesse, ou seja, com alto risco de cárie, podendo gerar assim, implicações diretas no desenvolvimento de novos produtos odontológicos com atividade anticariogênica eficaz.

Financiamento

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Referências

1. James SL, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018; 392(10159): 1789-858.
2. World Health Organization [Internet]. Current oral health situation at global level. cWHO 2017 [acesso em 2017 jul 21]. Disponível em: www.who.int/oral_health/policy/en.
3. Van Dommelen P, Schuller AA. The amount of care delivered: challenges of indices in oral health studies. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2016; 44(5): 485-92.
4. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ*. 2005; 83(9): 661-9.

5. Martins MT, Sardenberg F, Vale MP, Paiva SM, Pordeus IA. Dental caries and social factors: impact on quality of life in Brazilian children. *Braz Oral Res.* 2015; 29(1): S1806-83242015000100310.
6. ten Cate JM. The need for antibacterial approaches to improve caries control. *Adv Dent Res.* 2009; 21(1): 8-12.
7. Slot DE, Wiggelinkhuizen L, Rosema NA, Van der Weijden GA. The efficacy of manual toothbrushes following a brushing exercise: a systematic review. *Int J Dent Hyg.* 2012; 10(3): 187-97.
8. Roldán S, Herrera D, Santa-Cruz I, O'Connor A, González I, Sanz M. Comparative effects of different chlorhexidine mouth-rinse formulations on volatile sulphur compounds and salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol.* 2004; 31(12): 1128-34.
9. Ribeiro LG, Hashizume LN, Maltz M. The effect of different formulations of chlorhexidine in reducing levels of mutans streptococci in the oral cavity: a systematic review of the literature. *J Dent.* 2007; 35(5): 359-70.
10. Autio-Gold J. The role of chlorhexidine in caries prevention. *Oper Dent.* 2008; 33(6): 710-6.
11. James P, Worthington HV, Parnell C, Harding M, Lamont T, Cheung A, et al. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017; 3: CD008676
12. Vitkov L, Hermann A, Krautgartner WD, Hermann M, Fuchs K, Klappacher M, Hanning M. Chlorhexidine-induced ultrastructural alterations in oral biofilm. *Microsc Res Tech.* 2005; 68(2): 85-9.
13. Zanatta FB, Antoniazzi RP, Rösing CK. The effect of 0.12% chlorhexidine gluconate rinsing on previously plaque-free and plaque-covered surfaces: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2007; 78(11): 2127-34.
14. Hidalgo E, Dominguez C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. *Toxicol In Vitro.* 2001; 15(4-5): 271-6.
15. Faria G, Cardoso CR, Larson RE, Silva JS, Rossi MA. Chlorhexidine-induced apoptosis or necrosis in L929 fibroblasts: a role for endoplasmic reticulum stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009; 234(2): 256-65.

16. Carlin V, Matsumoto MA, Saraiva PP, Artioli A, Oshima CT, Ribeiro DA. Cytogenetic damage induced by mouthrinses formulations in vivo and in vitro. *Clin Oral Investig.* 2012; 16(3): 813-20.
17. Mankodi S, Bauroth K, Witt JJ, Bsoul S, He T, Gibb R, et al. A 6-month clinical trial to study the effects of a cetylpyridinium chloride mouthrinse on gingivitis and plaque. *Am J Dent.* 2005; 18 (Spec): 9A-14A.
18. Costa X, Laguna E, Herrera D, Serrano J, Alonso B, Sanz M. Efficacy of a new mouthrinse formulation based on 0.07% cetylpyridinium chloride in the control of plaque and gingivitis: a 6-month randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2013; 40(11): 1007-15.
19. Van Leeuwen M, Rosema N, Versteeg P, Slot D, Van Winkelhoff A, Van der Weijden G. Long-term efficacy of a 0.07% cetylpyridinium chloride mouth rinse in relation to plaque and gingivitis: a 6-month randomized, vehicle-controlled clinical trial. *Int J Dent Hyg.* 2015; 13(2): 93-103.
20. Roberts WR, Addy M. Comparison of the in vivo and in vitro antibacterial properties of antiseptic mouthrinses containing chlorhexidine, alexidine, cetyl pyridinium chloride and hexetidine. Relevance to mode of action. *J Clin Periodontol.* 1981; 8(4): 295-310.
21. Alves D, Costab AL, Almeida RF, Carvalho JFC, Felino A. Cloreto de cetilpiridínio - revisão da literatura. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac.* 2012; 53(3): 181-9.
22. Paraskevas S. Randomized controlled clinical trials on agents used for chemical plaque control. *Int J Dent Hyg.* 2005; 3(4): 162-78.
23. Schaeken MJM, van der Hoeven JS, Saxen CA, Cummins D. The effect of mouthrinses containing zinc and triclosan on plaque accumulation, development of gingivitis and formation of calculus in a 28-week clinical test. *J Clin Periodontol.* 1996; 23(5): 465-70.
24. Eley BM. Antibacterial agents in the control of supragingival plaque - a review. *Br Dent J.* 1999; 186(6): 286-96.

25. Boneta AE, Aguilar MM, Romeu FL, Stewart B, DeVizio W, Proskin HM. Comparative investigation of the efficacy of triclosan/copolymer/sodium fluoride and stannous fluoride/sodium hexametaphosphate/zinc lactate dentifrices for the control of established supragingival plaque and gingivitis in a six-month clinical study. *J Clin Dent*. 2010; 21(4): 117-23.
26. Neumegen RA, Fernández-Alba AR, Chisti Y. Toxicities of triclosan, phenol, and copper sulfate in activated sludge. *Environ Toxicol*. 2005; 20(2): 160-4.
27. Dias DA, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*. 2012; 2(2): 303-36.
28. Yuan H, Ma Q, Ye L, Piao G. The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules*. 2016; 21(5): pii: E559.
29. World Health Organization (WHO). Essential medicines and health products information portal: a World Health Organization resource. 2017 [acesso em 30 jul. 2018]. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jh2945e/2.2.html#Jh2945e.2.2>
30. Decreto Federal no 5.813, de 22 de junho de 2006. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterapia [Internet]. [acesso em 2016 mar 13]. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-/2006/Decreto/D5813.htm.
31. Ministério da Saúde. RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS [Internet]. [acesso em 2017 mar 03]. Disponível em <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>.
32. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard – eighth edition. Wayne: CLSI; 2012. [acesso em: 2016 Mar. 3]. Disponível em: http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M11A8_sample.pdf.
33. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 9th. Wayne: CLSI; 2015. [acesso em: 2016 Mar. 3]. Disponível em: http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M07A10_sample.pdf.

34. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard – twelfth edition. Wayne: CLSI; 2015. [acesso em: 2016 Mar. 3]. Disponível em: http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M02A12_sample.pdf.
35. Fani MM, Kohanteb J, Dayaghi M. Inhibitory activity of garlic (*Allium sativum*) extract on multidrug-resistant *Streptococcus mutans*. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2007; 25(4): 164-8.
36. Fani M, Kohanteb J. Inhibitory activity of Aloe vera gel on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. J Oral Sci. 2012; 54(1): 15-21.
37. Kermanshah H, Kamangar SS, Arami S, Kamalinegad M, Karimi M, Mirsalehian A, et al. The effect of hydro alcoholic extract of seven plants on cariogenic bacteria--an in vitro evaluation. Oral Health Dent Manag. 2014; 13(2): 395-401.
38. Goldback JC, Nascimento JE, Jacob RG, Fiorentini AM, Silva WP. Bioactivity of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus urograndis* against planktonic cells and biofilms of *Streptococcus mutans*. Industrial Crops Products. 2014; 60(2014): 304-9.
39. Brighenti FL, Salvador MJ, Delbem ACB, Delben ACB, Oliveira MA, Soares CP, et al. Systematic screening of plant extracts from the Brazilian Pantanal with antimicrobial activity against bacteria with cariogenic relevance. Caries Res. 2014; 48(5): 353-60.
40. Cecchini C, Silvi S, Cresci A, Piciotti A, Caprioli G, Papa F, et al. Antimicrobial efficacy of *Achillea ligustica* All. (Asteraceae) essential oils against reference and isolated oral microorganisms. Chem Biodivers. 2012; 9(1): 12-24.
41. Melo AFM, Santos EJV, Souza LFC, Carvalho AAT, Pereira MSV, Higino JS. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Anacardium occidentale* L. sobre espécies de *Streptococcus*. Rev Bras Farmacogn. 2006; 16(2): 202-5.
42. Sampaio FC, Pereira Mdo S, Dias CS, Costa VC, Conde NC, Buzalaf MA. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. J Ethnopharmacol. 2009; 124(2): 289-94.

43. Bersan SM, Galvão LC, Goes VF, Sartoratto A, Figueira GM, Rehder VL, et al. Action of essential oils from Brazilian native and exotic medicinal species on oral biofilms. *BMC Complement Altern Med*. 2014; 14: 451.
44. Botelho MA, Bezerra Filho JG, Correa LL, Fonseca SG, Montenegro D, Gapski R, et al. Effect of a novel essential oil mouthrinse without alcohol on gingivitis: a double-blinded randomized controlled trial. *J Appl Oral Sci*. 2007; 15(3): 175-80.
45. Vieira DR, Amaral FM, Maciel MC, Nascimento FR, Libério SA, Rodrigues VP. Plant species used in dental diseases: ethnopharmacology aspects and antimicrobial activity evaluation. *J Ethnopharmacol*. 2014; 155(3): 1441-9.
46. Giriraju A, Yunus GY. Assessment of antimicrobial potential of 10% ginger extract against *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and *Enterococcus faecalis*: an in vitro study. *Indian J Dent Res*. 2013; 24(4): 397-400.
47. Botelho MA, Nogueira NA, Bastos GM, Fonseca SG, Lemos TL, Matos FJ, Montenegro D, et al. 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.
48. Ccahuana-Vasquez RA, Dos Santos SSF, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Antimicrobial activity of *Uncaria tomentosa* against oral human pathogens. *Braz. Oral Res*. 2007; 21(1): 46-50.
49. Rodrigues IS, Tavares VN, Pereira SL, Costa FN. Antiplaque and antigingivitis effect of *Lippia Sidoides*: a double-blind clinical study in humans. *J Appl Oral Sci*. 2009; 17(5): 404-7.
50. Alves LA, Freires IA, Castro RD. Efeito antibacteriano de óleos essenciais sobre bactérias formadoras do biofilme dentário. *R Bras Ci Saúde*. 2010; 14(2):57-62.
51. Pieri FA, Mussi MC, Fiorini JE, Moreira MA, Schneedorf JM. Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. *Braz Dent J*. 2012; 23(1): 36-8.

52. Kriplani R, Thosar N, Baliga MS, Kulkarni P, Shah N, Yeluri R. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of various root canal filling materials along with aloe vera used in primary teeth: a microbiological study. *J Clin Pediatr Dent.* 2013; 37(3): 257-62.
53. Oliveira JR, Castro VC, 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.
54. Ferreira Filho JCC, Gondim BLC, Cunha DA, Figueiredo CC, Valença AMG. Physical properties and antibacterial activity of herbal tinctures of calendula (*Calendula officinalis* L.) and cashew tree (*Anacardium occidentale* L.). *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* 2014; 14(1): 49-53.
55. Oliveira C, Campos L, Duarte H, Bezerra L, Brandt L, Cardoso AMR, et al. Atividade antimicrobiana do óleo de copaifeira *officinalis* sobre bactérias do biofilme oral. *Rev Ciên Méd Biol.* 2016; 15(1): 34-8.
56. Cardoso AMR, Cavalcanti YW, Almeida LFD, Padilha WWN. Atividade antibacteriana de tinturas à base de plantas sobre microrganismos do biofilme dental. *Odontol Clin Cien.* 2012; 11(3): 212-4.
57. Wilson M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *J Med Microbiol.* 1996; 44(2):79-87.
58. Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 (Suppl 6): 7-15.
59. Furtado M, Alves F, Martins J, Vasconcelos M, Ramos V, Sousa G, et al. Effect of cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse extract on *Streptococcus mutans* and its biofilm. *Rev Bras Biociênc.* 2014; 12(1): 9-13.
60. Karygianni L, Al-Ahmad A, Argyropoulou A, Hellwig E, Anderson AC, Skaltsounis AL. Natural antimicrobials and oral microorganisms: a systematic review on herbal interventions for the eradication of multispecies oral biofilms. *Front Microbiol.* 2016; 6: 1529.

61. Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(7): 471-80.
62. Palmer Jr RJ. Supragingival and subgingival plaque: paradigm of biofilms. *Compend Contin Educ Dent.* 2010; 31(2): 104-6.
63. Koo H, Xiao J, Klein MI. Extracellular polysaccharides matrix - an often forgotten virulence factor in oral biofilm research. *Int J Oral Sci.* 2009; 1(4): 229-34.
64. Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Res.* 2011; 45(3): 243-63.
65. Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res.* 2013; 92(12): 1065-73.
66. Pihlstrom BL, Curran AE, Voelker HT, Kingman A. Randomized controlled trials: what are they and who needs them? *Periodontol 2000.* 2012; 59(1): 14-31.
67. Bakri IM, Douglas CW. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Arch Oral Biol.* 2005; 50(7): 645-51.
68. Anand G, Ravinanthan M, Basaviah R, Shetty AV. In vitro antimicrobial and cytotoxic effects of *Anacardium occidentale* and *Mangifera indica* in oral care. *J Pharm Bioallied Sci.* 2015; 7(1): 69-74.
69. Groppo FC, Ramacciato JC, Motta RH, Ferraresi PM, Sartoratto A. Antimicrobial activity of garlic against oral streptococci. *Int J Dent Hyg.* 2007; 5(2):109-15.
70. Barad MK, Ishnava KB, Chauhan JB. Anticariogenic activity and phytochemical studies of crude extract from some Indian plant leaves. *J Intercult Ethnopharmacol.* 2014; 3(2): 85-90.
71. Selestino Neta MC, Vittorazzi C, Guimarães AC, Martins JD, Fronza M, Endringer DC, et al. Effects of β -caryophyllene and *Murraya paniculata* essential oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24-h time-kill curve studies. *Pharm Biol.* 2017; 55(1): 190-7.

72. Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J Ethnopharmacol.* 2006; 106(3): 290-302.
73. Owhe-Ureghe UB, Ehwarieme DA, Eboh DO. Antibacterial activity of garlic and lime on isolates of extracted carious teeth. *Afr J Biotechnol.* 2010; 9(21): 3163-6.
74. Lee HJ, Park HS, Kim KH, Kwon TY, Hong SH. Effect of garlic on bacterial biofilm formation on orthodontic wire. *Angle Orthod.* 2011; 81(5): 895-900.
75. Araújo CR, Pereira JV, Pereira MV, Alves PM, Higino JS, Martins AB. Concentração mínima bactericida do extrato do cajueiro sobre bactérias do biofilme dental. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* 2009; 9(2): 187-91.
76. Rocha EALSS, Carvalho AVOR, Andrade SRA, Trovão DMMB, Medeiros ACD, Costa EMMB. Atividade antimicrobiana in vitro de extratos hidroalcoólicos de plantas medicinais do nordeste brasileiro em bactérias do gênero *Streptococcus*. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* 2013; 13(3): 233-8.
77. Vasconcelos KRF, Veiga Junior VF, Rocha WC, Bandeira MFCL. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne. *Rev Bras Farmacogn.* 2008; 18 (Supl.): 733-8.
78. Yatsuda R, Rosalen PL, Cury JA, Murata RM, Rehder VL, Melo LV, Koo H. Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. *J Ethnopharmacol.* 2005; 97(2): 183-99.
79. Pereira EM, Gomes RT, Freire NR, Aguiar EG, Brandão Md, Santos VR. In vitro antimicrobial activity of Brazilian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms of interest to dentistry. *Planta Med.* 2011; 77(4): 401-4.
80. Azizi A, Aghayan S, Zaker S, Shakeri M, Entezari N, Lawaf S. In vitro Effect of *Zingiber officinale* extract on growth of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *Int J Dent.* 2015; 2015: 489842.
81. Nunes RS, Lira AAM, Lacerda CM, Silva DOB, Silva JA, Santana DP. Obtenção e avaliação clínica de dentifrícios à base do extrato hidroalcoólico da *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae) sobre o biofilme dentário. *Rev Odontol UNESP.* 2006; 35(4): 275-83.

82. Lobo PL, Fonteles CS, de Carvalho CB, do Nascimento DF, da Cruz Fonseca SG, Jamacaru FV, et al. Dose-response evaluation of a novel essential oil against Mutans streptococci in vivo. *Phytomedicine*. 2011; 18(7): 551-6.
83. Rodrigues IS, de Oliveira DB, de Menezes PC, da Costa FN, Carlos MX, Pereira SL. Effect of *Lippia sidoides* in mouthrinses on de novo plaque formation: a double-blind clinical study in humans. *Indian J Dent Res*. 2013; 24(5): 533-6.
84. Lobo PL, Fonteles CS, Marques LA, Jamacaru FV, Fonseca SG, de Carvalho CB, et al. The efficacy of three formulations of *Lippia sidoides* Cham. essential oil in the reduction of salivary *Streptococcus mutans* in children with caries: a randomized, double-blind, controlled study. *Phytomedicine*. 2014; 21(8-9): 1043-7.
85. Menezes SM, Cordeiro LN, Viana GS. *Punica granatum* (pomegranate) extract is active against dental plaque. *J Herb Pharmacother*. 2006; 6(2): 79-92.

3.2 Publicação 2

Atividade antibacteriana e anti-aderente de óleos essenciais contra micro-organismos orais*

**Albuquerque YE¹, Okada PC¹, Figueira GM², Ramírez-Rueda RY², Salvador MJ²,
Brighenti FL¹**

¹UNESP – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Departamento de Clínica Infantil, Araraquara – SP, Brasil.

²Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia da Universidade de Campinas, UNICAMP – SP, Brasil.

Autor correspondente:

Fernanda Lourenção Brighenti

Rua Humaitá, 1680 – Centro

Araraquara – SP

CEP: 14801 – 903

Tel: +55 (16) 33016551

E-mail: fbrighenti@foar.unesp.br

*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

Resumo

O objetivo principal desse trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana e anti-aderente de óleos essenciais obtidos de sete plantas (*Baccharis trimera*, *Cordia curassavica*, *Eugenia uniflora*, *Foeniculum vulgare*, *Mentha pulegium*, *Ruta graveolens* e *Tagetes minuta*). O objetivo secundário foi comparar a atividade antibacteriana e anti-aderente de duas fontes de obtenção dos óleos essenciais. De cada espécie vegetal, foram obtidas amostras de óleos essenciais a partir de duas fontes (Fonte comercial: empresas especializadas; Fonte ex-situ: banco de germoplasma de Campinas). Foram utilizados micro-organismos de referência (*Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus mitis*). Como controle negativo, foi utilizado o diluente dos óleos essenciais (Tween 80) e para fins comparativos, foi utilizado o digluconato de clorexidina 0,12% (CHX). A concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais foram determinadas pela técnica de microdiluição em caldo. Os óleos essenciais mais ativos foram avaliados em concentrações sub-inibitórias (50 e 25% a CIM) quanto à sua atividade anti-aderente e caracterizados quimicamente. A origem do óleo essencial resultou em diferentes valores de CIM/CBM. Os óleos essenciais de *C. curassavica* e *E. uniflora* da Fonte comercial e os óleos essenciais de *E. uniflora* e *T. minuta* da Fonte ex-situ foram selecionados para as próximas etapas. Os óleos essenciais de *C. curassavica* (Fonte comercial) e *T. minuta* (Fonte ex-situ) apresentaram atividade anti-aderente para um número maior de cepas. Os constituintes majoritários dos óleos essenciais são em sua maioria sesquiterpenos. Conclui-se que os óleos essenciais de *C. curassavica* (Fonte comercial) e *T. minuta* (Fonte ex-situ) mostraram-se mais efetivos. Óleos essenciais obtidos a partir de fonte comercial podem ser tão efetivos quanto óleos obtidos a partir de coleções ex-situ.

Palavras-chave: Placa dentária. Óleos. Plantas medicinais.

Introdução

A cárie dentária é considerada um desafio para a Odontologia pois, apesar das evidências de declínio da sua prevalência na população¹⁻³, ainda acomete grande parte da população adulta e infantil⁴.

O biofilme dentário é constituído por micro-organismos orais envolvidos por uma matriz extracelular, cuja complexidade estrutural permite o aumento da sua resistência às substâncias antimicrobianas⁵. Dentre as substâncias antimicrobianas disponíveis no mercado, destaca-se a clorexidina, substância que possui ação comprovada no controle da microbiota salivar^{6,7}. É muito utilizada para o controle do biofilme dentário⁸, porém, quando utilizada por períodos prolongados, causa manchamento dos dentes, alterações do paladar e sensação de queimação⁹. Alguns autores relatam, ainda, aumento da sua resistência a alguns micro-organismos^{10,11}, ação limitada em biofilmes maduros^{12,13} e a ocorrência de efeito citotóxico e indução de danos genéticos¹⁴⁻¹⁶.

Produtos naturais de origem vegetal têm sido investigados quanto ao seu potencial na prevenção e tratamento de doenças bucais. Levando em conta a grande biodiversidade brasileira, o Governo Federal criou a “Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterapia”, com o objetivo de fomentar pesquisas para atender as necessidades epidemiológicas do país¹⁷. Em 2009, esse decreto resultou na criação da RENISUS, Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, que apresenta uma lista de 71 plantas com potencial para gerar produtos de interesse ao SUS. Essas plantas foram selecionadas levando em consideração as indicações terapêuticas, toxicidade, farmacologia, uso tradicional, entre outros aspectos¹⁸. Dentre essas plantas, encontram-se as espécies *Baccharis trimera*, *Cordia curassavica*, *Eugenia uniflora*, *Foeniculum vulgare*, *Mentha puleguim*, *Ruta graveolens* e *Tagetes minuta*. Essas plantas apresentam evidência de atividade antimicrobiana de seus extratos ou óleos essenciais contra micro-organismos não-cariogênicos¹⁹⁻²⁸.

Óleos essenciais selecionados a partir de plantas listadas na RENISUS podem possuir potencial farmacológico para o controle da cárie dentária, podendo ser utilizados futuramente como princípios ativos nas formulações de novos produtos. As principais fontes de obtenção de material vegetal para o preparo de extratos e óleos essenciais são coleções in situ (plantas conservadas no próprio local de origem) e ex-situ (plantas conservadas fora do lugar de origem)²⁹⁻³¹. Alguns óleos essenciais também podem ser adquiridos comercialmente. O uso de fontes comerciais apresenta

como vantagem a pronta disponibilidade dos óleos essenciais. Ainda, empresas especializadas realizam controle de qualidade dos óleos disponibilizados, podendo evitar assim, eventuais vieses. Entretanto, ainda não há dados a respeito da efetividade de óleos essenciais adquiridos comercialmente em comparação à óleos essenciais obtidos a partir de fontes in situ ou ex-situ. Essa comparação é importante porque a atividade biológica de produtos naturais está diretamente relacionada com a fonte e o modo de obtenção³²⁻³⁴.

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana e anti-aderente de óleos essenciais a partir de plantas incluídas na RENISUS. O objetivo secundário foi comparar a atividade antibacteriana e anti-aderente desses óleos essenciais obtidos a partir de duas diferentes fontes.

Materiais e métodos

Seleção das espécies vegetais

O presente projeto foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen (Número do cadastro: A93EDB1) (ANEXO A).

As espécies vegetais foram selecionadas de acordo com os seguintes critérios: 1) Constar na lista da RENISUS; 2) Possuir atividade antibacteriana descrita na literatura; 3) Possuir óleo essencial comercial disponível para aquisição.

Com base nos critérios estabelecidos, as seguintes espécies foram selecionadas: *Baccharis trimera* (carqueja amarga), *Cordia curassavica* (erva baleeira), *Eugenia uniflora* (pitanga), *Foeniculum vulgare* (funcho doce), *Mentha puleguim* (poejo), *Ruta graveolens* (arruda) e *Tagetes minuta* (cravo de defunto).

Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram obtidos em quantidade suficiente para a realização de todo o estudo a partir de duas fontes: comercial e coleção ex-situ.

Os óleos essenciais da fonte comercial foram adquiridos nas empresas Laszlo Aromaterapia Ltda. (Belo Horizonte – MG) (*B. trimera*, *E. uniflora*, *F. vulgare*, *M. puleguim*, *R. graveolens* e *T. minuta*) e Quinari Fragâncias e Cosméticos Ltda (Ponta Grossa – PR) (*C. curassavica*). Esses óleos comerciais foram preparados pelo método de extração de arraste à vapor.

Os óleos essenciais da coleção ex-situ foram obtidos a partir do banco de germoplasma da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA) do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas –UNICAMP, localizado na cidade de Paulínia (22°45'00" Sul e 47°10'21" Oeste). O material vegetal foi coletado entre agosto e setembro/2016. Os óleos essenciais foram preparados por hidrodestilação durante 3 h em aparelho de Clevenger, de acordo com a metodologia descrita por Albuquerque et al.³⁵ (2018). A retirada da água foi realizada com sulfato de sódio anidro e o rendimento em massa dos óleos foi determinado (rendimento = [massa final/massa inicial]*100) (Tabela 1).

Os óleos essenciais foram armazenados em frasco de vidro âmbar a -20 °C. As informações gerais sobre as espécies vegetais e as fontes de obtenção dos óleos essenciais estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1- Informações gerais dos óleos essenciais.

Família	Nome científico	Nome popular	Fonte	Lote (comercial)*	Registro (ex-situ)**	Rendimento em massa (%) (ex-situ)**
Apiaceae	<i>F. vulgare</i>	Funcho doce	folhas e caule	002104	UEC*** 184687	0,20
Asteraceae	<i>B. trimera</i>	carqueja amarga	partes aéreas	001668	UEC 184154	0,05
	<i>T. minuta</i>	cravo de defunto	partes aéreas	1314	CPMA**** 10450	0,10
Boraginaceae	<i>C. curassavica</i>	erva-baleeira	partes aéreas	0717/05209/F	UEC 112744	1,00
Lamiaceae	<i>M. pulegium</i>	poejo	partes aéreas da floração	001839	UEC 121402	0,30
Myrtaceae	<i>E. uniflora</i>	pitanga	folhas	002178	UEC 184186	0,30
Rutaceae	<i>R. graveolens</i>	arruda	partes aéreas da floração	001696	CPMA 376	1,40

*Fonte comercial: óleos essenciais adquiridos nas empresas Laszlo Aromaterapia Ltda. e Quinari Fragâncias e Cosméticos Ltda.; ** Fonte "ex-situ: óleos essenciais adquiridos a partir do banco de germoplasma da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA) do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas –UNICAMP; ***UEC: voucher da espécie depositada no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC) - Instituto de Biologia, UNICAMP; ****CPMA: voucher da espécie depositada no Herbário da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA), UNICAMP. Fonte: Elaboração própria.

Micro-organismos e condições de crescimento

Foram utilizados os seguintes micro-organismos de referência: a) colonizadores iniciais: *Actinomyces naeslundii* ATCC 19039, *Streptococcus oralis* ATCC 10557, *Streptococcus parasanguinis* ATCC 903, *Streptococcus salivarius* ATCC 7073 e *Streptococcus mitis* ATCC 9811 e b) bactérias de reconhecida cariogenicidade: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 e *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Essas cepas permaneceram armazenadas com 20% de glicerol a -20 °C em caldo BHI (Brighenti et al.²⁹, 2014). As cepas foram cedidas pelo Instituto Nacional Controle Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz.

Culturas de 72 h em ágar sangue (*A. naeslundii*) e culturas de 48 h em ágar BHI (*L. acidophilus* e *Streptococcus* spp.) desses micro-organismos foram utilizadas para obtenção de uma suspensão em solução salina contendo aproximadamente 10⁷ UFC/mL, com o auxílio de um espectrofotômetro. As incubações foram realizadas a 37 °C em 5% CO₂ por 48 h.

Triagem da atividade antibacteriana dos óleos essenciais

A triagem da atividade antibacteriana dos óleos essenciais foi avaliada através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).

Os óleos essenciais foram diluídos em Tween 80 e caldo BHI na proporção 1:1:8 (v/v). Como controle negativo, foi utilizado Tween 80 e água destilada diluído em caldo BHI na mesma proporção. Para fins comparativos da atividade antibacteriana, foi utilizado um produto comercial (Periogard®; digluconato de clorexidina 0,12%).

Foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo baseada no Clinical and Laboratory Standards Institute³⁶, com modificações²⁹. Os experimentos foram realizados em duplicata. Nos poços da primeira coluna da placa de 96 poços, foram inseridos 100 µL do óleo essencial diluído ou 50 µL de digluconato de clorexidina 0,12% e 50 µL de caldo BHI duas vezes concentrado. Diluições seriadas de razão dois foram obtidas de modo a serem testadas concentrações entre 0,1 µL/mL e 100 µL/mL (v/v) dos óleos essenciais e entre 0,0006 e 0,6 µL/mL (v/v) do digluconato de clorexidina 0,12%. Em seguida, as suspensões preparadas foram adicionadas de forma a obter uma concentração final de aproximadamente 10⁵ UFC/mL³⁶. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C em 5% CO₂. Em seguida, os poços foram submetidos a uma subcultura em ágar BHI para avaliação da CIM e CBM. A avaliação

da presença de crescimento bacteriano foi realizada através de inspeção visual. A CIM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento e a CBM foi determinada como a menor concentração capaz de resultar na morte microbiana³⁶.

Foi considerada atividade antibacteriana positiva os óleos essenciais que apresentaram CIM menor ou igual a 3,13 µL/mL (para *A. naeslundii*); 6,25 µL/mL (para *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. salivarius*, *S. mitis* e *L. acidophilus*) ou 12,5 µL/mL (para *S. parasanguinis*). Diferentes critérios foram adotados para *A. naeslundii* e *S. parasanguinis*, pois essas cepas apresentaram, respectivamente, menor ou maior sensibilidade aos óleos essenciais em comparação às outras cepas. Os óleos essenciais foram classificados de acordo com a quantidade de cepas que apresentaram atividade antibacteriana positiva e os melhores classificados foram selecionados para avaliação da atividade anti-aderente.

Influência dos óleos essenciais na aderência de micro-organismos orais

Foi avaliada a capacidade de concentrações sub-inibitórias (25 e 50% o valor da CIM) dos óleos essenciais em impedir a aderência de micro-organismos ao vidro. Foi utilizado um modelo de aderência ativa³⁷. Lamínulas de vidro (Ø 13 mm; n=12/grupo) foram suspensas verticalmente em placas de 24 poços contendo 1,62 mL de caldo BHI suplementado com 0,2% de sacarose com concentrações sub-inibitórias (25 e 50% o valor da CIM) dos óleos essenciais³⁸. Em seguida, 180 µL da suspensão preparada para cada micro-organismo foram adicionados em cada poço de forma a obter uma concentração final de aproximadamente 10⁵ UFC/mL³⁶. Como controle negativo, foi utilizado o diluente do óleo essencial (Tween 80) diluído no meio de cultura em concentração equivalente a 50% do maior valor de CIM encontrado (1,25%). Para fins comparativos, foi utilizado um produto comercial (Periogard®; digluconato de clorexidina 0,12%) também em concentrações sub-inibitórias (50 e 25% o valor da CIM).

Após incubação por 24 h a 37 °C, os micro-organismos aderidos às lamínulas foram lavados em NaCl 0,9% e dispersos em banho de ultrassom por 10 s (Cuba de ultrassom Cristófoli, Campo Mourão – PR, Brasil, 42 kHz). As suspensões de micro-organismos foram diluídas, semeadas em ágar BHI (limite de detecção de 22 UFC/mL) e incubadas a 37 °C nas condições descritas anteriormente. O número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foi obtido com o auxílio de um contador de colônias.

Os resultados foram expressos em log variação da viabilidade ($\log 1+ \text{UFC/mL}$ do grupo controle – $\log 1+ \text{UFC/mL}$ grupos tratamento). Foram considerados ativos os óleos essenciais que apresentaram log variação igual ou maior a 2³⁹. Os óleos essenciais foram classificados de acordo os seus desempenhos neste teste.

Caracterização química dos óleos essenciais mais ativos

A caracterização química foi realizada seguindo a metodologia descrita por Pascoal et al.⁴⁰ (2011). As análises por cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (CG/EM; 70 eV) foram realizadas em equipamento Shimadzu CG/EM equipado com uma coluna capilar Durabond-DB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) e operado de acordo com metodologia descrita por Stefanello et al. (2008)⁴¹: 60 °C por 3 min e, em seguida, foi programada uma rampa de 60-220 °C com aumento de 5 °C/min e depois mantido em isoterma a 220 °C por 5 min. O gás de arraste foi o hélio (1 mL/min) e a temperatura do injetor e do detector de 250 °C. As análises foram realizadas no modo de injeção split 1:20. Os componentes foram identificados com base em dois parâmetros: por comparação de seus índices de retenção, sendo calculado o Índice de Kovats pela corrida nas mesmas condições de padrão de n-alcanos (Sigma-Adrich) e pela análise dos espectros de massas por comparação com aqueles encontrados na literatura e em banco de dados. As análises foram realizadas em triplicata.

Análise dos dados

Os resultados dos testes de CIM e CBM e da caracterização química foram analisados descritivamente. Os óleos essenciais que apresentaram o maior número de cepas com atividade antibacteriana positiva foram selecionados para avaliação da influência dos óleos essenciais na formação inicial de biofilmes.

Os dados obtidos no teste de formação inicial de biofilmes foram analisados com o programa SPSS versão 22.0 (Armonk, NY: IBM Corp.). Os dados não apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk, $p < 0,05$). Foi utilizado o teste de Mann Whitney para comparação das variáveis independentes 25% e 50% o valor da CIM e teste de Kruskal Wallis, seguido de teste post hoc de Dunn, para comparar os tratamentos dentro de uma mesma concentração. O nível de significância foi estabelecido em 5%. Os óleos essenciais foram classificados de acordo com o número de cepas que apresentaram variação da viabilidade $\geq 2 \log 1+ \text{UFC/mL}$.

Resultados

Os valores de CIM dos óleos essenciais variaram de 0,78 a >100 µL/mL e de CBM variaram de 3,13 a >100 µL/mL (Tabelas 2 e 3). A CHX apresentou os menores valores de CIM/CBM para todas as cepas. Ao se comparar as duas fontes de obtenção dos óleos essenciais, os valores de CIM da Fonte comercial foram de 8 a 32 vezes menores que os valores de CIM da Fonte ex-situ para *C. curassavica*, *E. uniflora*, *F. vulgare* e *M. pulegium*. Para os óleos *B. trimera*, *R. graveolens* e *T. minuta*, os valores de CIM da Fonte ex-situ foram de 8 a 16 vezes menores em comparação à Fonte comercial (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2- Valores de CIM (concentração inibitória mínima) e CBM (concentração bactericida mínima) dos óleos essenciais da Fonte comercial e digluconato de clorexidina (µL/mL)

	<i>A. naeslundii</i>		<i>L. acidophilus</i>		<i>S. mutans</i>		<i>S. mitis</i>		<i>S. oralis</i>		<i>S. parasanguinis</i>		<i>S. salivarius</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>B. trimera</i>	6,25	100	6,25	> 100	6,25	> 100	6,25	25	6,25	50	25	50	> 100	> 100
<i>C. curassavica</i>	3,13	> 100	3,13	100	6,25	100	12,5	25	0,78	3,13	12,5	25	25	50
<i>E. uniflora</i>	3,13	> 100	3,13	50	1,56	100	6,25	12,5	1,56	3,13	6,25	25	25	50
<i>F. vulgare</i>	25	> 100	100	> 100	> 100	> 100	100	> 100	12,5	100	25	50	> 100	> 100
<i>M. pulegium</i>	6,25	25	12,5	25	50	100	50	50	6,25	12,5	25	100	100	> 100
<i>R. graveolens</i>	100	> 100	100	> 100	100	> 100	100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>T. minuta</i>	12,5	> 100	50	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
CHX 0,12%	0,002	0,01	0,001	0,002	0,002	0,005	0,01	0,08	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

CHX: digluconato de clorexidina

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 3- Valores de CIM (concentração inibitória mínima) e CBM (concentração bactericida mínima) dos óleos essenciais da Fonte ex-situ (µL/mL)

	<i>A. naeslundii</i>		<i>L. acidophilus</i>		<i>S. mutans</i>		<i>S. mitis</i>		<i>S. oralis</i>		<i>S. parasanguinis</i>		<i>S. salivarius</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>B. trimera</i>	0,78	12,5	1,56	3,13	1,56	100	3,13	6,25	1,56	12,5	12,5	12,5	6,25	12,5
<i>C. curassavica</i>	25	100	50	> 100	12,5	> 100	25	50	25	25	50	100	> 100	> 100
<i>E. uniflora</i>	3,13	25	6,25	50	12,5	> 100	6,25	12,5	12,5	25	25	50	25	50
<i>F. vulgare</i>	100	> 100	100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	50	100	> 100	> 100
<i>M. pulegium</i>	25	100	50	100	> 100	> 100	100	100	100	100	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>R. graveolens</i>	25	100	12,5	25	100	> 100	25	50	100	> 100	100	> 100	> 100	> 100
<i>T. minuta</i>	3,13	25	12,5	25	25	> 100	6,25	12,5	25	25	25	25	25	25

Fonte: Elaboração própria.

A Tabela 4 mostra a quantidade de cepas sensíveis aos diferentes óleos essenciais e a classificação dos óleos essenciais em ordem decrescente de cepas sensíveis. De um modo geral, a Fonte comercial apresentou óleos essenciais com o maior número de cepas sensíveis do que a Fonte ex-situ (Tabela 4). Para a classificação individual, o óleo essencial de *B. trimera* (ex-situ) apresentou o melhor desempenho, seguido de *E. uniflora* (comercial), *C. curassavica* (comercial), *B. trimera* (comercial), *E. uniflora* (ex-situ) e *T. minuta* (ex-situ) (Tabela 4).

Com base nos resultados apresentados nas Tabelas 2 a 4, os seguintes óleos essenciais foram selecionados para avaliação da atividade anti-aderente: *C. curassavica* (Fonte comercial), *E. uniflora* (Fontes comercial e ex-situ), e *T. minuta* (Fonte ex-situ). O óleo essencial de *B. trimera* da Fonte ex-situ foi excluído devido ao seu baixo rendimento em massa (0,05%) (Tabela 1), o que inviabilizaria sua futura incorporação em formulações farmacêuticas. O óleo essencial de *B. trimera* da Fonte comercial foi excluído por ter apresentado CBM maior ou igual a 100 µL/mL para quatro cepas de referência (Tabela 2).

Tabela 4- Atividade antimicrobiana e classificação dos óleos essenciais de acordo com os critérios estabelecidos.

	Fonte	CIM							Total*	Classificação**
		<i>A. naeslundii</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mitis</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. parasanguinis</i>	<i>S. salivarius</i>		
<i>B. trimera</i>	comercial	-	+	+	+	+	-	-	4	4º
	ex-situ	+	+	+	+	+	+	+	7	1º
<i>C. curassavica</i>	comercial	+	+	+	-	+	+	-	5	3º
	ex-situ	-	-	-	-	-	-	-	0	8º
<i>E. uniflora</i>	comercial	+	+	+	+	+	+	-	6	2º
	ex-situ	+	+	-	+	-	-	-	3	5º
<i>F. vulgare</i>	comercial	-	-	-	-	-	-	-	0	8º
	ex-situ	-	-	-	-	-	-	-	0	8º
<i>M. pulegium</i>	comercial	-	-	-	-	+	-	-	1	7º
	ex-situ	-	-	-	-	-	-	-	0	8º
<i>R. graveolens</i>	comercial	-	-	-	-	-	-	-	0	8º
	ex-situ	-	-	-	-	-	-	-	0	8º
<i>T. minuta</i>	comercial	-	-	-	-	-	-	-	0	8º
	ex-situ	+	-	-	+	-	-	-	2	6º

*Quantidade de cepas sensíveis de acordo com os critérios estabelecidos; **Classificação dos óleos essenciais em ordem decrescente de cepas sensíveis.

Fonte: Elaboração própria.

O óleo essencial de *C. curassavica* da fonte comercial apresentou capacidade anti-aderente significativamente melhor do que a CHX contra *S. mutans* em ambas as concentrações testadas. O óleo essencial de *T. minuta* da fonte ex-situ apresentou capacidade anti-aderente significativamente melhor do que a CHX contra *S. mutans* na concentração de 50% o valor da CIM (Tabela 5).

O óleo essencial de *C. curassavica* da fonte comercial apresentou atividade anti-aderente positiva (variação da viabilidade ≥ 2 log UFC/mL) para as espécies de reconhecida cariogenicidade (*S. mutans* e *L. acidophilus*) em ambas as concentrações testadas. Dentre os colonizadores iniciais, o óleo de *T. minuta* da coleção ex-situ teve desempenho estatisticamente semelhante à CHX para três espécies (*A. naeslundii*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*) em ambas as concentrações testadas. Alguns óleos essenciais (*E. uniflora* de ambas as fontes e *T. minuta* da fonte ex-situ) estimularam a aderência de *S. mitis* ou *S. oralis*. Todos os tratamentos inibiram totalmente a aderência de *A. naeslundii*, exceto o óleo essencial *E. uniflora* da fonte ex-situ. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de 25 e 50% a CIM em 51% dos casos ($p > 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5- Variação da viabilidade (log 1+ UFC/mL) de micro-organismos presentes nos biofilmes (média $\pm$ dp) de acordo com os tratamentos selecionados (n=12) nas concentrações de 25% e 50% o valor da CIM (n=12) a partir de diferentes fontes (comercial ou ex-situ). Letras minúsculas distintas demonstram diferenças estatísticas entre as concentrações 25% e 50% o valor da CIM dentro de cada tratamento (teste de Mann Whitney, $p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas demonstram diferenças estatísticas entre os tratamentos dentro de uma mesma concentração (teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste post hoc de Dunn, $p < 0,05$).

	CHX		<i>C. curassavica</i> (Fonte comercial)		<i>E. uniflora</i> (Fonte comercial)		<i>E. uniflora</i> (Fonte ex-situ)		<i>T. minuta</i> (Fonte ex-situ)	
	50% CIM	25% CIM	50% CIM	25% CIM	50% CIM	25% CIM	50% CIM	25% CIM	50% CIM	25% CIM
<i>A. naeslundii</i>	4,92 (0,00) ^{a,A}	4,92 (0,00) ^{a,A}	4,92 (0,00) ^{a,A}	4,92 (0,00) ^{a,A}	4,92 (0,00) ^{a,A}	4,92 (0,00) ^{a,A}	4,92 (0,00) ^{a,A}	4,34 (1,08) ^{b,B}	4,92 (0,00) ^{a,A}	4,92 (0,00) ^{a,A}
<i>L. acidophilus</i>	4,71 (0,57) ^{a,A}	2,60 (1,09) ^{b,A}	4,47 (0,97) ^{a,A}	4,35 (0,98) ^{a,B}	1,44 (0,43) ^{a,B}	1,72 (0,48) ^{a,C}	2,06 (0,43) ^{a,B}	1,33 (0,45) ^{b,C}	0,93 (0,42) ^{a,B}	0,52 (0,33) ^{a,D}
<i>S. mutans</i>	2,86 (0,55) ^{a,A}	1,41 (0,26) ^{b,A}	3,82 (1,30) ^{a,B}	3,18 (2,23) ^{b,B}	1,52 (0,23) ^{a,BC}	1,54 (0,36) ^{a,A}	1,99 (0,29) ^{a,AC}	1,69 (0,56) ^{a,A}	3,76 (0,29) ^{a,A}	1,96 (1,89) ^{b,A}
<i>S. mitis</i>	3,25 (1,11) ^{a,A}	1,13 (0,60) ^{b,A}	1,58 (0,82) ^{a,B}	1,03 (0,36) ^{b,B}	0,59 (0,21) ^{a,C}	0,47 (0,17) ^{a,C}	-0,09 (0,27) ^{a,D}	-0,50 (0,09) ^{b,C}	-0,12 (0,23) ^{a,D}	-0,16 (0,23) ^{a,D}
<i>S. oralis</i>	4,03 (0,00) ^{a,A}	2,92 (1,39) ^{b,A}	1,60 (1,48) ^{a,B}	3,38 (1,21) ^{b,B}	-0,22 (0,08) ^{a,C}	-0,32 (0,07) ^{a,C}	2,45 (1,66) ^{a,D}	0,32 (0,53) ^{b,D}	4,03 (0,00) ^{a,A}	4,03 (0,00) ^{a,E}
<i>S. parasanguinis</i>	5,17 (0,00) ^{a,A}	1,99 (0,27) ^{b,A}	1,52 (0,34) ^{a,B}	0,91 (0,30) ^{b,B}	2,39 (0,70) ^{a,C}	1,91 (0,32) ^{b,A}	2,27 (0,37) ^{a,C}	1,34 (0,33) ^{b,CE}	5,17 (0,00) ^{a,A}	1,53 (0,31) ^{a,DE}
<i>S. salivarius</i>	4,83 (0,00) ^{a,A}	4,83 (0,00) ^{a,A}	4,14 (0,22) ^{a,AC}	2,95 (0,31) ^{b,B}	4,83 (0,00) ^{a,A}	1,16 (0,17) ^{b,C}	2,97 (1,42) ^{a,BC}	3,24 (1,46) ^{a,D}	3,82 (1,50) ^{a,A}	3,75 (1,63) ^{a,D}

Fonte: Elaboração própria.

Os óleos essenciais que apresentaram a maior capacidade anti-aderente contra as cepas de referência testadas foram *C. curassavica* da fonte comercial e *T. minuta* da coleção ex-situ (Tabela 6).

Tabela 6- Classificação da atividade anti-aderente dos óleos essenciais.

	50% CIM*	25% CIM*	Total*	Classificação**
<i>C. curassavica</i> (Fonte comercial)	4	4	8	1º
<i>E. uniflora</i> (Fonte comercial)	3	1	4	3º
<i>E. uniflora</i> (Fonte “ex-situ”)	5	2	7	2º
<i>T. minuta</i> (Fonte “ex-situ”)	5	3	8	1º

*Quantidade de cepas cujos biofilmes apresentaram log redução de ≤ -2 ; **Classificação em ordem decrescente da efetividade das substâncias testadas.

Fonte: Elaboração própria.

Um total de 63, 29, 30 e 42 compostos foram apontados na caracterização dos óleos essenciais de *C. curassavica* (Fonte comercial), *E. uniflora* (Fonte comercial), *E. uniflora* (Fonte ex-situ) e *T. minuta* (Fonte ex-situ), respectivamente. Não foram identificados 11%, 31%, 6,7% e 19% dos compostos presentes nesses óleos essenciais, respectivamente (Tabelas 7-10). Os componentes majoritários dos óleos essenciais são em sua maioria sesquiterpenos.

O óleo essencial de *C. curassavica* (Fonte comercial) é composto majoritariamente por Dehydroxy-isocalamendiol (10,05%), Bicyclogermacrene (8,04%), Allo-Aromadendrene (6,33%), β -Sesquiphellandrene (6,01%) e Caryophyllene (5%) (Tabela 7).

Os óleos essenciais de *E. uniflora* das Fontes comercial e ex-situ são compostos majoritariamente por cyclopentanecarboxylic acid (Fonte comercial: 32,32%; Fonte ex-situ: 30,22%) e β -Bisabolen-12-ol (Fonte comercial: 34,95%; Fonte ex-situ: 34,50%). Entretanto, a composição geral do óleo essencial da Fonte comercial se difere em aproximadamente 45% da composição do óleo essencial da Fonte ex-situ (Tabelas 8 e 9).

O óleo essencial de *T. minuta* (Fonte comercial) é composto majoritariamente por Terpinolen (14,40%), D-Limonene (11,26%), β -cis-

Ocimene (8,37%), α -Cubebene (5,64%) e 5,7-Octadien-4-one, 2,6-dimethyl-, (E)- (5,42%) (Tabela 10).

O composto caryophyllene oxide foi identificado na caracterização química dos quatro óleos essenciais.

Tabela 7- Caracterização química do óleo essencial de *C. curassavica* (Fonte comercial) por análise de CG/EM (Continua).

Peak	RT	%Area	Componentes	KI
1	3.741	0.62	3-Thujene	902
2	3.862	2.42	α -Pinene	933
3	4.106	0.09	Camphene	948
4	4.519	0.17	β -Phellandrene	973
5	4.585	1.08	(-)- β -Pinene	977
6	5.668	0.71	D-Limonene	1033
7	11.832	0.22	Bornyl acetate	1289
8	13.082	0.83	Δ -Elemene	1329
9	13.401	0.07	α -Cubebene	1351
10	13.611	0.26	Citronellol acetate	1359
11	13.813	0.15	(+)-Cyclosativene	1367
12	13.858	0.13	Ylangene	1369
13	14.073	0.59	Copaene	1378
14	14.301	0.47	2,4-Diisopropenyl-1-methyl-1-vinylcyclohexane	1387
15	14.508	3.66	β -Elemene	1395
16	14.919	0.57	(-)- α -Gurjunene	1412
17	15.025	0.10	β -Patchoulene	1416
18	15.215	5.00*	Caryophyllene	1424
19	15.336	0.24	γ -Elemene	1429
20	15.48	0.68	β -Gurjunene	1435
21	15.549	0.85	α -Bergamotene	1438
22	16.023	2.45	γ -Caryophyllene	1457
23	16.256	6.33*	Allo-Aromadendrene	1467
24	16.571	0.94	γ -Muurolene	1480
25	16.729	3.37	α -Curcumen	1486
26	16.815	1.16	Eudesma-4(14),11-diene	1490
27	17.062	8.04*	Bicyclogermacrene	1500
28	17.169	1.03	α -Muurolene	1504
29	17.336	1.72	β -Bisabolene	1512
30	17.521	3.68	Shyobunone	1519
31	17.73	6.01*	β -Sesquiphellandrene	1529
32	17.876	1.27	β -cedren-9- α -o	1536

RT: Retention time (min); KI: Kovats Index; %AREA: Peak área; NI: Não identificado; *Componente majoritários.

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 7- Caracterização química do óleo essencial de *C. curassavica* (Fonte comercial) por análise de CG/EM (Conclusão).

Peak	RT	%Area	Componentes	KI
33	18.035	0.35	7-epi- α -Cadinene	1542
34	18.179	0.92	α -Calacorene	1548
35	18.521	4.97	Longifolenaldehyde	1563
36	18.658	0.72	Cadala-1(10),3,8-triene	1569
37	18.776	0.55	Germacrene D-4-ol	1574
38	18.978	1.77	NI	1582
39	19.051	2.28	Spathulenol	1585
40	19.127	0.64	Caryophyllene oxide	1589
41	19.193	0.68	Globulol	1591
42	19.378	0.93	Viridiflorol	1599
43	19.45	0.45	NI	1603
44	19.73	10.05*	Dehydroxy-isocalamendiol	1616
45	19.815	1.21	NI	1619
46	19.901	0.77	NI	1623
47	20.022	0.31	NI	1629
48	20.091	0.85	NI	1632
49	20.208	2.37	Dehydroxy-isocalamendiol	1637
50	20.351	2.71	2,4-Dimethyl-3-nitrobicyclo[3.3.1]nonan-9-one	1643
51	20.457	2.08	γ -Cadinol	1648
52	20.579	0.85	(-)- Δ -Cadinol	1653
53	20.7	0.13	β -Selinenol	1659
54	20.786	2.00	α -Cadinol	1663
55	20.894	2.11	Spiro[4.5]dec-6-en-8-one, 1,7-dimethyl-4-(1-methylethyl)-	1668
56	21.144	0.34	4-Isopropyl-1-methoxy-1,6-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene	1679
57	21.25	0.11	Cadalene	1684
58	21.356	0.56	6-Isopropenyl-4,8a-dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-naphthalen-2-ol	1689
59	21.575	0.86	Carotol	1699
60	21.778	0.52	trans-Farnesol	1708
61	22.77	1.75	(6E)-3,7,11-Trimethyl-1,6,10-dodecatrien-3-yl formate 2,5,5,8a-Tetramethyl-4-methylene-6,7,8,8a-tetrahydro-4H,5H-chromen-4a-yl hydroperoxide	1755
62	23.025	0.32		1767
63	23.339	0.50	NI	1782

RT: Retention time (min); KI: Kovats Index; %AREA: Peak área; NI: Não identificado; *Componente majoritários.

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 8- Caracterização química do óleo essencial de *E. uniflora* (Fonte comercial) por análise de CG/EM.

Peak	RT	%Area	Componentes	KI
1	14,553	0.93	β -Elemene	1397
2	15,220	0.24	β -Caryophyllene	1424
3	15,564	1.08	γ -Elemene	1438
4	16,883	0.14	α -Selinene	1492
5	17,136	3.85	Curzerene	1503
6	18,531	0.50	Germacrene B	1563
7	18,807	0.36	NI	1575
8	19,060	3.37	4-Chlorobutyric acid, 3-methylphenyl ester	1586
9	19,163	0.53	Caryophyllene oxide	1590
10	19,225	0.41	NI	1593
11	19,383	0.23	(-)-Globulol	1600
12	19,545	0.19	4-Isopropenyl-5-methyl-2-(1-methylethylidene)-5-vinylcyclohexanone	1607
13	19,650	2.99	β -Elemenone	1612
14	20,306	32.32*	Cyclopentanecarboxylic acid, 2-ethylcyclohexyl ester	1641
15	20,833	0.92	Juniper camphor	1665
16	21,314	0.50	NI	1687
17	21,692	4.97	Germacron	1704
18	21,898	0.31	NI	1714
19	22,061	0.53	NI	1721
20	22,261	1.66	2-(4a,8-Dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-naphthalen-2-yl)-prop-2-en-1-ol	1731
21	22,802	34.95*	β -Bisabolen-12-ol	1756
22	23,267	0.67	NI	1778
23	23,358	2.39	NI	1783
24	24,413	0.96	7a-Isopropenyl-4,5-dimethyloctahydroindene-4-carboxylic acid	1834
25	24,846	1.80	Chloroacetic acid, dodec-9-ynyl ester	1856
26	25,486	0.88	4,14-Dimethyl-11-isopropyltricyclo[7,5,0,0(10,14)]tetradec-4-en-8-one	1887
27	26,125	0.63	NI	1920
28	26,635	0.47	NI	1946
29	28,439	1.22	18,20-Cyclopregnan-20-ol	2040

RT: Retention time (min); KI: Kovats Index; %AREA: Peak area; NI: Não identificado; *Componentes majoritários.

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 9- Caracterização química do óleo essencial de *E. uniflora* (Fonte ex-situ) por análise de CG/EM.

Peak	RT	%Area	Componentes	KI
1	11,952	0.27	Epoxylinolol	1292
2	13,168	0.05	d-Elemene	1340
3	14,142	0.12	α -Cubebene	1378
4	14,553	1.06	β -Elemene	1394
5	15,220	0.25	β -Caryophyllene	1422
6	15,564	1.17	g-Elemene	1436
7	16,059	0.11	a-Caryophyllene	1456
8	16,610	0.20	Allo-Aromadendrene	1479
9	16,708	0.18	a-Amorphene	1483
10	16,889	0.37	g-Bulnesene	1491
11	17,136	4.49	Curzerene	1500
12	17,745	0.12	d-Cadinen	1527
13	18,531	0.53	Germacrene B	1561
14	18,807	0.58	trans-Longipinocarveol	1572
15	19,060	3.36	4-Chlorobutyric acid, 3-methylphenyl ester	1583
16	19,163	1.04	Caryophyllene oxide	1588
17	19,395	0.41	Cubenol	1598
18	19,545	0.36	4-Isopropenyl-2-isopropylidene-5-methyl-5-vinylcyclohexanone	1604
19	19,650	3.61	β -Elemenone	1609
20	19,872	0.22	Selina-6-en-4-ol	1619
21	19,967	0.07	Drimenol	1623
22	20,306	30.22*	Cyclopentanecarboxylic acid, 2-ethylcyclohexyl ester	1639
23	20,833	1.48	Juniper camphor	1662
24	21,692	5.26	Germacron	1701
25	22,261	1.86	2-(4a,8-Dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-naphthalen-2-yl)-prop-2-en-1-ol	1728
26	22,802	34.50*	β -Bisabolen-12-ol	1754
27	24,413	1.86	7a-Isopropenyl-4,5-dimethyloctahydroindene-4-carboxylic acid	1832
28	24,846	3.05	Chloroacetic acid, dodec-9-ynyl ester	1853
29	25,486	1.58	4,14-Dimethyl-11-isopropyltricyclo[7,5,0,0(10,14)]tetradec-4-en-8-one	1885
30	28,439	1.62	18,20-Cyclopregnan-20-ol	2038

RT: Retention time (min); KI: Kovats Index; %AREA: Peak area; NI: Não identificado; *Componentes majoritários.

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 10- Caracterização química do óleo essencial de *T. minuta* (Fonte ex-situ) por análise de CG/EM.

Peak	RT	%Area	Compound	KI
1	3,863	0.54	α -Pinene	933
2	4,114	0.08	Camphene	949
3	4,525	1.57	Sabinen	974
4	4,829	0.23	β -Myrcene	992
5	5,104	0.59	α -Phellandrene	1007
6	5,597	11.26*	D-Limonene	1030
7	5,759	8.37*	β -cis-Ocimene	1038
8	5,995	1.00	β -trans-Ocimene	1049
9	6,129	1.29	Methyl 2-oxohexanoate	1055
10	6,237	0.25	γ -Terpinen	1060
11	6,707	0.14	α -Pinene epoxide	1082
12	6,931	14.40*	Terpinolen	1093
13	7,083	0.99	Myrcenol	1100
14	7,303	0.64	Linalool	1098
15	7,587	0.46	NI	1120
16	7,872	1.68	2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-, (E,Z)-	1132
17	7,975	2.55	3-Cyclohexene-1-methanol	1136
18	8,070	0.73	o-Methylacetophenone	1140
19	8,228	1.03	NI	1146
20	8,309	2.49	5-Octyn-4-one, 2,7-dimethyl-	1149
21	8,528	5.42*	5,7-Octadien-4-one, 2,6-dimethyl-, (E)-	1158
22	9,215	0.59	4-Hexen-1-ol, 2-ethenyl-2,5-dimethyl-	1186
23	10,529	3.33	(1E)-1-Ethylidene-7a-methyloctahydro-1H-indene	1238
24	10,772	3.01	7a-Methyl-1,4,5,6,7,7a-hexahydro-2H-inden-2-one	1248
25	11,138	4.82	Piperitone	1252
26	11,825	0.18	L-bornyl acetate	1289
27	11,883	0.22	NI	1291
28	13,089	0.24	Δ -Elemene	1339
29	13,488	5.64*	α -Cubebene	1355
30	15,176	2.7	Caryophyllene	1422
31	16,687	0.58	Germacrene D	1484
32	17,063	0.5	Bicyclogermacrene	1500
33	19,170	0.26	Caryophyllene oxide	1590
34	24,515	3.52	trans-11-Tetradecenyl acetate	1839
35	26,578	1.89	2,6,11,15-Tetramethyl-hexadeca-2,6,8,10,14-pentaene	1943
36	26,901	1.05	1,3-Dioxolan-2-one, 3-methyl-3-(4,8-dimethylnona-3,7-dienyl)-4-methylene	1960
37	29,186	1.14	NI	2079
38	29,861	3.79	Cyclopropanecarboxylic acid, 1-methyl-, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenyl ester	2114
39	30,388	1.09	NI	2141
40	30,821	1.68	NI	2164
41	31,512	2.97	NI	2200
42	33,624	5.09	NI	2310

RT: Retention time (min); KI: Kovats Index; %AREA: Peak area; NI: Não identificado; *Componentes majoritários.

Fonte: Elaboração própria.

Discussão

Este estudo teve o objetivo de avaliar a atividade antibacteriana e anti-aderente de óleos essenciais de duas fontes a partir de plantas medicinais listadas na RENISUS, a fim de auxiliar no desenvolvimento de novos produtos eficazes na prevenção e controle da cárie dentária. Vários estudos têm demonstrado a atividade antimicrobiana de óleos essenciais contra bactérias orais^{30,42,43}. Entretanto, este é o primeiro trabalho que avaliou a capacidade dos óleos essenciais selecionados em inibir a formação inicial de biofilmes. A capacidade de inibir a aderência inicial de micro-organismos à superfície dentária dificultará o processo de formação e maturação de biofilmes cariogênicos.

Desse ponto de vista, ao contrário do que já foi praticado anteriormente⁴⁴, é importante o uso de concentrações sub-inibitórias dos produtos naturais, uma vez que se deseja exercer atividade anti-aderente e não necessariamente bactericida contra os micro-organismos em estudo. Essa abordagem visa a manutenção da homeostase no biofilme dentário, o que vai de encontro com as teorias contemporâneas sobre a etiopatogenia da cárie dentária^{45,46}. Recomenda-se, também, o estudo de mais de uma concentração sub-inibitória, visto que os resultados do presente estudo demonstraram diferentes comportamentos em 49% das situações avaliadas. A obtenção de um produto natural que apresente efetividade na menor concentração possível é desejável a fim de reduzir o custo do produto.

A maioria dos estudos que avaliaram a capacidade de produtos naturais em inibir a aderência e a formação de biofilmes utilizam apenas uma espécie bacteriana (*S. mutans*)^{44,47-49}. Os resultados do presente estudo corroboram com a idéia de que a inclusão de diversas cepas de referência para o estudo da atividade antibacteriana de produtos naturais é essencial, uma vez que os grupos microbianos exercem diferentes funções na formação do biofilme dentário e no desenvolvimento e progressão de lesões de cárie²⁹. As cepas utilizadas no presente estudo incluem pelo menos um representante de quatro dos cinco grupos filogenéticos de estreptococos *viridans* (*Mutans*, *Salivarius*, *Anginosus*, *Sanguinis* e *Mitis*), além de *L. acidophilus* e *A. naeslundii*.

Um resultado encontrado no presente estudo foi o estímulo de crescimento de *S. mitis* e *S. oralis* por *E. uniflora* (comercial) e *T. minuta* (ex-situ)

em comparação ao grupo controle negativo. Embora até o momento não se saiba exatamente o que pode ter causado este estímulo, essas espécies bacterianas pertencem ao grupo filogenético Mitis e compreendem boa parte dos estreptococos presentes nas superfícies dos dentes durante a fase inicial da formação do biofilme⁵⁰. Essas espécies produzem substâncias que possuem efeitos antagônicos ao estabelecimento de *S. mutans* e lactobacilos, como bacteriocinas, surfactantes e peróxido de hidrogênio⁵¹. Desse modo, o estímulo de crescimento dessas espécies bacterianas poderia auxiliar também na manutenção da homeostase do biofilme bucal, o que deve ser estudado futuramente.

Até o presente momento, não há estudos comparando a atividade antimicrobiana de óleos essenciais obtidos a partir de fontes comerciais ou ex-situ. O uso de óleos comercialmente disponíveis pode ser criticado devido à dificuldade em se controlar a época de colheita e o método de obtenção do produto. Entretanto, os resultados do presente estudo demonstram que o desempenho dos óleos essenciais não está relacionado com a procedência. Desse modo, recomenda-se o estudo de óleos essenciais obtidos a partir de diferentes fontes sempre que possível. O uso de fontes comerciais é vantajoso porque os produtos se encontraram prontamente disponíveis para serem utilizados pela indústria farmacêutica, dispensando o estabelecimento de uma sistemática de produção agrícola da espécie vegetal de interesse. Eventuais vieses no controle de qualidade dos óleos comerciais podem ser evitados através da análise dos produtos por cromatografia em camada delgada ou cromatografia a gás, utilizando os componentes majoritários como marcadores de qualidade.

Os óleos essenciais de *C. curassavica* (Fonte comercial) e de *T. minuta* (Fonte ex-situ) se mostraram igualmente efetivos na capacidade de inibir a aderência dos micro-organismos (Tabela 6), podendo ser utilizados na elaboração de novos produtos antibacterianos. O custo da adição desses óleos essenciais em concentrações sub-inibitórias seria de R\$ 0,05 a 0,10 e de R\$ 0,03 a 0,06 por mililitro de produto para, respectivamente, *C. curassavica* e *T. minuta*, levando em consideração o valor do óleo essencial adquirido a partir da Fonte comercial. É interessante notar que, de todos os óleos testados quanto à capacidade anti-aderente, o óleo de *T. minuta* foi o que apresentou o pior

desempenho quanto à classificação no número de cepas sensíveis (Tabela 4). Essa observação serve de importante alerta, pois nem sempre o valor da CIM está diretamente relacionado ao desempenho de produtos naturais contra biofilmes, pois os mecanismos de inibição de crescimento são diferentes dos mecanismos de inibição de aderência e de formação de biofilme.

Relatos de atividade antimicrobiana e antibiofilme foram encontrados na literatura para apenas dois constituintes majoritários (caryophyllene e D-limonene)⁵²⁻⁵⁶. Observa-se, também, que os óleos essenciais estudados possuem uma composição complexa, no qual mesmo os constituintes majoritários estão frequentemente em baixas concentrações. Os componentes majoritários identificados nos óleos essenciais são sesquiterpenos, uma classe de terpenos muito comum na natureza⁵⁷. Embora o modo de ação antibacteriano dos terpenos ainda não seja totalmente conhecido, alguns trabalhos relatam que seu alvo mais provável seja a membrana externa ou a parede celular das bactérias, causando danos à integridade estrutural das células bacterianas e alterações morfológicas. Essas alterações resultam em mudanças na permeabilidade da membrana e desequilíbrio osmótico, ocasionando no vazamento de moléculas intracelulares, alterações da função da membrana celular e indução de distúrbios na cadeia respiratória⁵⁷⁻⁵⁹. Portanto, considerando que a ação antimicrobiana dos óleos essenciais é o resultado do efeito combinado dos seus diferentes constituintes e não apenas de um composto isolado⁶⁰ e que os constituintes podem apresentar diferentes mecanismos de ação⁶¹, o fracionamento dos óleos para o isolamento da porção mais ativa nem sempre resulta em melhor atividade biológica. Há relatos de menor atividade antimicrobiana e anti-aderente se o fracionamento for realizado, conforme descrito anteriormente na literatura⁶².

Os resultados do presente estudo demonstram que espécies listadas na RENISUS podem ser melhor exploradas com o objetivo de controlar doenças da cavidade bucal pois, de acordo com um estudo anterior (Publicação 1), apenas uma pequena parte dessas plantas foram avaliadas quanto ao seu potencial anticariogênico.

Estudos futuros para elucidar o mecanismo de ação dos óleos essenciais de *C. curassavica* e *T. minuta*, para avaliar a citotoxicidade e para comprovar a eficácia clínica desses óleos essenciais devem ser realizados.

Conclusão

Conclui-se que os óleos essenciais de plantas listadas na RENISUS podem apresentar potencial antimicrobiano para a elaboração de novos produtos com propriedades anticariogênicas. Os óleos essenciais de *C. curassavica* (Fonte comercial) e *T. minuta* (Fonte ex-situ) mostraram-se mais efetivos. Óleos essenciais obtidos a partir de fonte comercial podem ser tão efetivos quanto óleos obtidos a partir de coleções ex-situ. Quando possível, recomenda-se o estudo de ambas as fontes.

Financiamento

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradecimentos

Nossos agradecimentos ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz por ter cedido as cepas utilizadas nesse projeto e a CAPES pelo suporte financeiro.

Referências

1. Ministério da Saúde. Pesquisa nacional de saúde bucal: resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde; 2010. [acesso em 26 set. 2018]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pesquisa_nacional_saude_bucal.pdf
2. Gathecha G, Makokha A, Wanzala P, Omolo J, Smith P. Dental caries and oral health practices among 12 year old children in Nairobi West and Mathira West Districts, Kenya. Pan Afr Med J. 2012; 12: 42.
3. Vird M, editor. Oral health care: pediatric, research, epidemiology and clinical practices. London: Intechopen; 2012.
4. World Health Organization [Internet]. Current oral health situation at global level. cWHO 2010 [acesso em 2010 jul 30]. Disponível em: www.who.int/oral_health/policy/en.

5. Wang Z, de la Fuente-Núñez C, Shen Y, Haapasalo M, Hancock RE. Treatment of oral multispecies biofilms by an anti-biofilm peptid. *PLoS One*. 2015; 10(7): e0132512.
6. Roldán S, Herrera D, Santa-Cruz I, O'Connor A, González I, Sanz M. Comparative effects of different chlorhexidine mouth-rinse formulations on volatile sulphur compounds and salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol*. 2004; 31(12): 1128-34.
7. Ribeiro LG, Hashizume LN, Maltz M. The effect of different formulations of chlorhexidine in reducing levels of mutans streptococci in the oral cavity: a systematic review of the literature. *J Dent*. 2007; 35(5): 359-70.
8. Balagopal S, Arjunkumar R. Chlorhexidine: the gold standard antiplaque agente. *J Pharm Sci Res*. 2013; 5(12): 270-4.
9. James P, Worthington HV, Parnell C, Harding M, Lamont T, Cheung A, et al. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017; 3: CD008676.
10. Saleem HG, Seers CA, Sabri AN, Reynolds EC. Dental plaque bacteria with reduced susceptibility to chlorhexidine are multidrug resistant. *BMC Microbiol*. 2016; 16: 214.
11. Morrissey I, Oggioni MR, Knight D, Curiao T, Coque T, Kalkanci A, et al. Evaluation of epidemiological cut-off values indicates that biocide resistant subpopulations are uncommon in natural isolates of clinically-relevant microorganisms. *PLoS One*. 2014; 9(1): e86669.
12. Vitkov L, Hermann A, Krautgartner WD, Hermann M, Fuchs K, Klappacher M, et al. Chlorhexidine-induced ultrastructural alterations in oral biofilm. *Microsc Res Tech*. 2005; 68(2): 85-9.
13. Zanatta FB, Antoniazzi RP, Rösing CK. The effect of 0.12% chlorhexidine gluconate rinsing on previously plaque-free and plaque-covered surfaces: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2007; 78(11): 2127-34.
14. Hidalgo E, Dominguez C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. *Toxicol In Vitro*. 2001; 15(4-5): 271-6.

15. Faria G, Cardoso CR, Larson RE, Silva JS, Rossi MA. Chlorhexidine-induced apoptosis or necrosis in L929 fibroblasts: a role for endoplasmic reticulum stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009; 234(2): 256-65.
16. Carlin V, Matsumoto MA, Saraiva PP, Artioli A, Oshima CT, Ribeiro DA. Cytogenetic damage induced by mouthrinses formulations in vivo and in vitro. *Clin Oral Investig.* 2012; 16(3): 813-20.
17. Decreto Federal no 5.813, de 22 de junho de 2006. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterapia [Internet]. [acesso em 2013 abr 13]. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-/2006/Decreto/D5813.htm>.
18. Portal da Saúde [Internet]. Plantas de interesse ao SUS. 2015 [acesso em 2015 maio 15]. Disponível em: portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/465-sctie-raiz/daf-raiz/ceaf-sctie/fitoterapicos-cgafb/l1-fitoterapicos/12552-plantas-de-interesse-ao-sus.
19. Carvalho RS, Aleixo AA, Camargos VN, Santos M, Herrera KMS, Magalhães JT, et al. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de *Baccharis Trimeria* (Less.) Dc (Asteraceae) frente as bactérias de importância médica. *Biochem Biot Repor.* 2013; 2(2): 45-7.
20. Hernandez T, Canales M, Teran B, Avila O, Duran A, Garcia AM, et al. Antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Cordia curassavica* (Boraginaceae). *J Ethnopharmacol.* 2007; 111(1): 137-41.
21. Silva NC, Barbosa L, Seito LN, Fernandes A Jr. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. *Nat Prod Res.* 2012; 26(16): 1510-4.
22. Victoria FN, Lenardão EJ, Savegnago L, Perin G, Jacob RG, Alves D, et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: antioxidant and antimicrobial properties. *Food Chem Toxicol.* 2012; 50(8): 2668-74.
23. Esquivel-Ferriño PC, Favela-Hernández JM, Garza-González E, Waksman N, Ríos MY, del Rayo Camacho-Corona M. Antimycobacterial activity of constituents from *Foeniculum vulgare* var. dulce grown in Mexico. *Molecules.* 2012; 17(7): 8471-82.

24. Mahboubi M, Haghi G. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *J Ethnopharmacol.* 2008; 119(2): 325-7.
25. Haddouchi F, Chaouche TM, Zaouali Y, Ksouri R, Attou A, Benmansour A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. *Food Chem.* 2013; 141(1): 253-8.
26. Ibrahim AK. New terpenoids from *Mentha pulegium* L. and their antimicrobial activity. *Nat Prod Res.* 2013; 27(8): 691-6.
27. Shirazi MT, Gholami H, Kavoosi G, Rowshan V, Tafsiry A. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Tagetes minuta* and *Ocimum basilicum* essential oils. *Food Sci Nutr.* 2014; 2(2): 146-55.
28. Igwaran A, Iweriebor BC, Ofuzim Okoh S, Nwodo UU, Obi LC, Okoh AI. Chemical constituents, antibacterial and antioxidant properties of the essential oil flower of *Tagetes minuta* grown in Cala community Eastern Cape, South Africa. *BMC Complement Altern Med.* 2017; 17(1): 351.
29. Brighenti FL, Salvador MJ, Delbem AC, Delbem AC, Oliveira MA, Soares CP, et al. Systematic screening of plant extracts from the Brazilian Pantanal with antimicrobial activity against bacteria with cariogenic relevance. *Caries Res.* 2014; 48(5): 353-60.
30. Freires IA, Bueno-Silva B, Galvão LCC, Duarte MCT, Sartoratto A, Figueira GM, et al. The effect of essential oils and bioactive fractions on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* biofilms: a confocal analysis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015; 2015: 1-9.
31. Akhalwaya S, van Vuuren S, Patel M. An in vitro investigation of indigenous South African medicinal plants used to treat oral infections. *J Ethnopharmacol.* 2018; 210: 359-71.
32. Zouari S, Ayadi I, Fakhfakh N, Jdir H, Aloui L, Kossentini M, et al. Essential oil variation in wild populations of *Artemisia saharae* (Asteraceae) from Tunisia: chemical composition, antibacterial and antioxidant properties. *Bot Stud.* 2014; 55(1): 76.

33. Mohammadhosseini M. Chemical composition of the essential oils and volatile fractions from flowers, stems and roots of *Salvia multicaulis* Vahl. by using MAHD, SFME and HS-SPME methods. *J Essent Oil Bear Plants*. 2015; 18: 1360-71.
34. Nekoei M, Mohammadhosseini M. Chemical compositions of the essential oils from the aerial parts of *Achillea wilhelmsii* using traditional hydrodistillation, microwave assisted hydrodistillation and solvent-free microwave extraction methods: comparison with the volatile compounds obtained by headspace solid phase microextraction. *J Essent Oil Bear Plants*. 2016; 19: 59-75.
35. Albuquerque YE, Danelon M, Salvador MJ, Koga-Ito CY, Botazzo Delbem AC, Ramirez-Rueda RY, et al. Mouthwash containing *Croton doctoris* essential oil: in vitro study using a validated model of caries induction. *Future Microbiol*. 2018; 13: 631-43.
36. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 9th. Wayne: CLSI; 2012. [acesso em: 2016 Mar. 3]. Disponível em: <file:///C:/Users/Home/Downloads/03-CLSI-M07-A9-2012.pdf>.
37. Exterkate RA, Crielaard W, ten Cate JM. Different response to amine fluoride by *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model. *Caries Res*. 2010; 44(4): 372-9.
38. Di Bonaventura G, Spedicato I, D'Antonio D, Robuffo I, Piccolomini R. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, and ceftazidime. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 151-60.
39. Song JH, Yang TC, Chang KW, Han SK, Yi HK, Jeon JG. In vitro effects of a fraction separated from *Polygonum cuspidatum* root on the viability, in suspension and biofilms, and biofilm formation of *mutans streptococci*. *J Ethnopharmacol*. 2007; 112(3): 419-25.

40. Pascoal CRFA, Lourenço CC, Sodek L, Tamashiro JY, Franchi G Jr, Nowill A, et al. Essential oil from the leaves of *Campomanesia guaviroba* (DC.) Kiaersk. (Myrtaceae): chemical composition, antioxidant and cytotoxic activity. *J Essent Oil Res.* 2011; 23: 34-7.
41. Stefanello MEA, Cerv AC, ITO IY, Salvador M. J. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Eugenia chlorophyll* (Myrtaceae). *J Essen Oil Res.* 2008; 20: 75-8.
42. Freires IA, Denny C, Benso B, de Alencar SM, Rosalen PL. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review. *Molecules.* 2015; 20(4): 7329-58.
43. Cruz Martínez C, Diaz Gómez M, Oh MS. Use of traditional herbal medicine as an alternative in dental treatment in Mexican dentistry: a review. *Pharm Biol.* 2017; 55(1): 1992-8.
44. Lee HJ, Park HS, Kim KH, Kwon TY, Hong SH. Effect of garlic on bacterial biofilm formation on orthodontic wire. *Angle Orthod.* 2011; 81(5): 895-900.
45. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adven Dent Res.* 1994; 8(2): 263-71.
46. Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res.* 2008; 42(6): 409-18.
47. Goldback JC, Nascimento JE, Jacob RG, Fiorentini AM, Silva WP. Bioactivity of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus urograndis* against planktonic cells and biofilms of *Streptococcus mutans*. *Industrial Crops Products.* 2014; 60(2014): 304-9.
48. Kacergius T, Abu-Lafi S, Kirkliauskiene A, Gabe V, Adawi A, Rayan M, et al. Inhibitory capacity of *Rhus coriaria* L. extract and its major component methyl gallate on *Streptococcus mutans* biofilm formation by optical profilometry: Potential applications for oral health. *Mol Med Rep.* 2017; 16(1): 949-56.

49. Sá NC, Cavalcante TTA, Araújo AX, dos Santos HS, Albuquerque MRJR, Bandeira PN, et al. Antimicrobial and antibiofilm action os Casbane Diterpene from *Croton napetaefolius* against oral bactéria. *Arch Oral Biol*. 2011; 57(5): 550-5.
50. Do T, Jolley KA, Maiden MCJ, Gilbert SC, Clark D, Wade WG, et al. Population structure of *Streptococcus oralis*. *Microbiology*. 2009; 155(Pt 8): 2593-602.
51. Ouennane S, Leprohon P, Moineau S. Diverse virulent pneumophages infect *Streptococcus mitis*. *PLoS One*. 2015; 10(2): e0118807.
52. Souza AB, Martins CH, Souza MG, Furtado NA, Heleno VC, de Sousa JP, et al. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. *Phytother Res*. 2011; 25(2): 215-20.
53. Subramenium GA, Vijayakumar K, Pandian SK. Limonene inhibits streptococcal biofilm formation by targeting surface-associated virulence factors. *J Med Microbiol*. 2015; 64(8): 879-90.
54. Pieri FA, Souza MC, Vermelho LL, Vermelho ML, Perciano PG, Vargas FS, et al. Use of β -caryophyllene to combat bacterial dental plaque formation in dogs. *BMC Vet Res*. 2016; 12(1): 216.
55. Selestino Neta MC, Vittorazzi C, Guimarães AC, Martins JD, Fronza M, Endringer DC, et al. Effects of β -caryophyllene and *Murraya paniculata* essential oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24-h time-kill curve studies. *Pharm Biol*. 2017; 55(1): 190-7.
56. Yoo HJ, Jwa SK. Inhibitory effects of β -caryophyllene on *Streptococcus mutans* biofilm. *Arch Oral Biol*. 2018; 88: 42-6.
57. Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(6): 2474-8.
58. Zengin H, Baysal AH. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-

activity relationships evaluated by SEM microscopy. *Molecules*. 2014; 19(11): 17773-98.

59. Silva GNS, Pozzatti P, Rigatti F, Hörner R, Alves SH, Mallmann CA, Heinzmann BA. Antimicrobial evaluation of sesquiterpene α -curcumene and its synergism with imipenem. *J Microbiol Biotech Food Sci*. 2015; 4(5) 434-6.

60. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12(4): 564-82.

61. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - a review. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46(2): 446-75.

62. Furletti VF, Teixeira IP, Obando-Pereda G, Mardegan RC, Sartoratto A, Figueira GM, et al. Action of *Coriandrum sativum* L. essential oil upon oral *Candida albicans* biofilm formation. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011; 2011: 985832.

3.3 Publicação 3

Comportamento de biofilmes de *S. mutans* e polimicrobianos e capacidade de óleos essenciais em interferir na maturação de biofilmes*

Albuquerque YE¹, Figueira GM², Leite IS³, Inada NM³, Brighenti FL¹.

¹UNESP – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Departamento de Clínica Infantil, Araraquara – SP, Brasil.

²Instituto de Biologia da Universidade de Campinas, Departamento de Biologia Vegetal, UNICAMP – SP, Brasil.

³Instituto de Física de São Carlos, Departamento de Biofotônica, USP – SP, Brasil.

Autor correspondente:

Fernanda Lourenção Brighenti

Rua Humaitá, 1680 – Centro

Araraquara – SP

CEP: 14801 – 903

Tel: +55 (16) 33016551

E-mail: fbrighenti@foar.unesp.br

*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

Resumo

O objetivo desse trabalho foi comparar o comportamento de biofilmes monotípicos de *Streptococcus mutans* com biofilmes polimicrobianos e avaliar a capacidade de óleos essenciais (*Baccharis trimera*, *Cordia curassavica*, *Eugenia uniflora*, *Foeniculum vulgare*, *Mentha pulegium*, *Ruta graveolens* e *Tagetes minuta*) em interferir na maturação desses biofilmes. De cada espécie vegetal, foram obtidas duas amostras de óleos essenciais a partir de fontes diferentes (Fonte comercial e Fonte ex-situ). Foram utilizados a saliva de 12 voluntários para o crescimento de biofilmes polimicrobianos e *S. mutans* para o crescimento de biofilmes monotípicos. Como controle negativo, foi utilizado o diluente dos óleos essenciais (Tween 80) e para fins comparativos, foi utilizado o digluconato de clorexidina 0,12% (CHX). A concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais foram determinadas. Os óleos essenciais mais ativos foram testados na concentração 10 vezes a CIM quanto a capacidade em interferir na maturação de biofilmes. A acidogenicidade dos biofilmes foi avaliada em cada troca do meio de cultura, por meio da aferição do seu pH. Após quatro dias, os biofilmes foram coletados e analisados quanto a sua composição microbiológica e bioquímica. A citotoxicidade dos óleos essenciais foi avaliada, utilizando cultura de fibroblastos e queratinócitos. Os valores de CIM e CBM dos óleos essenciais da Fonte comercial foram diferentes dos encontrados para os óleos essenciais da Fonte ex-situ. O óleo essencial de *E. uniflora* de ambas as fontes apresentaram valores satisfatórios de CIM (<25 µL/mL) para ambos os inóculos e foram selecionados para as etapas seguintes. Em biofilmes, o óleo essencial de *E. uniflora* de ambas as Fontes foram efetivos na redução da viabilidade microbiana e da acidogenicidade. Biofilmes polimicrobianos apresentaram comportamento diferente em comparação à biofilmes de *S. mutans* (menor quantificação microbiana, maior acidogenicidade e composição bioquímica). A citotoxicidade dos óleos de *E. uniflora* de ambas as fontes foram menores ou iguais à citotoxicidade da CHX nos dois tipos celulares. Conclui-se que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais variou de acordo com o tipo do inóculo estudado. O óleo essencial de *E. uniflora* de ambas as fontes foi efetivo. O uso de biofilmes polimicrobianos determina de maneira mais real a ação antimicrobiana de produtos naturais.

Palavras-chave: Óleos. Placa dentária. Produtos com ação antimicrobiana.

Introdução

Apesar de a remoção mecânica ser a medida preventiva mais indicada para o controle do biofilme dentário¹, muitos indivíduos não sabem ou não conseguem realizá-la da maneira correta. O uso de antimicrobianos tem sido indicado como coadjuvantes nessas situações. A clorexidina é um antimicrobiano muito utilizado em estudos clínicos para o controle do biofilme dentário e da gengivite^{2,3}. Entretanto, o seu uso causa efeitos colaterais indesejáveis⁴ e pode aumentar a resistência das bactérias da cavidade oral^{5,6}. Portanto, necessita-se explorar fontes alternativas para o desenvolvimento de produtos eficazes que não causem tais efeitos.

O Brasil apresenta uma grande biodiversidade de plantas, cujos óleos essenciais podem ser estudados. A Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS (RENISUS) é uma lista disponibilizada pelo Governo Federal com o intuito de fomentar pesquisas para gerar produtos de interesse ao SUS⁷. Nesta lista, constam os nomes das espécies de plantas *Baccharis trimera* (carqueja amarga), *Cordia curassavica* (erva-baleeira), *Eugenia uniflora* (pitanga), *Foeniculum vulgare* (funcho doce), *Mentha puleguim* (poejo), *Ruta graveolens* (arruda) e *Tagetes minuta* (cravo de defunto). Essas plantas são muito conhecidas no território brasileiro e seus óleos essenciais ou extratos apresentam evidência de atividade antimicrobiana contra micro-organismos não cariogênicos⁸⁻¹⁷ e contra alguns micro-organismos cariogênicos^{18,19}.

Adicionalmente, estudos de atividade antimicrobiana de produtos naturais utilizaram biofilmes monotípicos, como por exemplo, biofilmes de *S. mutans*²⁰⁻²³, o que não reflete a situação clínica da cavidade oral. Na cavidade oral, a grande diversidade de espécies microbianas interage entre si, o que confere comportamento diferenciado e maior resistência a substâncias antimicrobianas²⁴. O uso de biofilmes polimicrobianos obtidos a partir da saliva de voluntários tem sido indicado por manter a complexidade e a heterogeneidade do biofilme dentário²⁵.

Diante disso, a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas listadas na RENISUS necessita ser investigada. Ainda, o uso de biofilmes que possam mimetizar o ambiente natural da cavidade oral é essencial. Devido a diferenças no metabolismo e no comportamento entre biofilmes monotípicos e

polimicrobianos, a ação dos óleos essenciais nesses biofilmes deve ser avaliada e comparada. Portanto, o objetivo desse trabalho foi comparar o comportamento de biofilmes monotípicos de *S. mutans* com biofilmes polimicrobianos e avaliar a capacidade de óleos essenciais obtidos a partir de plantas incluídas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS (*Baccharis trimera*, *Cordia curassavica*, *Eugenia uniflora*, *Foeniculum vulgare*, *Mentha pulegium*, *Ruta graveolens* e *Tagetes minuta*) em interferir na dinâmica de maturação desses biofilmes.

Materiais e métodos

Seleção das espécies vegetais

As espécies vegetais foram selecionadas de acordo com os seguintes critérios: 1) Constar na lista da RENISUS; 2) Possuir atividade antimicrobiana descrita na literatura; 3) Disponibilidade comercial do óleo essencial para aquisição. As informações das espécies selecionadas estão descritas na Tabela 1.

Obtenção dos óleos essenciais

O presente projeto foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen (Número do cadastro: A93EDB1) (ANEXO A).

Os óleos essenciais foram obtidos a partir de duas fontes diferentes, uma comercial e outra a partir de uma coleção ex-situ. Os óleos essenciais comerciais foram adquiridos nas empresas Laszlo Aromaterapia Ltda. (Belo Horizonte – MG) (*Baccharis trimera*, *Eugenia uniflora*, *Foeniculum vulgare*, *Mentha pulegium*, *Ruta graveolens* e *Tagetes minuta*) e Quinari Fragâncias e Cosméticos Ltda (Ponta Grossa – PR) (*Cordia curassavica*). Esses óleos comerciais foram preparados pelo método de extração de destilação à vapor.

Os óleos essenciais da coleção ex-situ foram obtidos a partir do banco de germoplasma da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA) do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – UNICAMP, localizado na cidade de Paulínia (22° 7980' 32,00" Sul e 47° 1134' 36,00" Oeste). O material vegetal foi coletado entre agosto e setembro/2016. Os

óleos essenciais foram preparados por hidrodestilação durante 3 h em aparelho de Clevenger, de acordo com a metodologia descrita por Albuquerque et al.²⁶ (2018). A retirada da água foi realizada com sulfato de sódio anidro e o rendimento em massa dos óleos foram determinados ($\text{rendimento} = [\text{massa final/massa inicial}] * 100$) (Tabela 1).

Os óleos essenciais foram obtidos em quantidade suficiente para a realização de todo o estudo e armazenados em frasco de vidro âmbar a -20°C .

Tabela 1- Informações gerais dos óleos essenciais.

Família	Nome científico	Nome popular	Fonte	Lote (comercial)*	Registro (ex-situ)**	Rendimento em massa (%) (ex-situ)**
Apiaceae	<i>F. vulgare</i>	Funcho doce	folhas e caule	002104	UEC*** 184687	0,2
Asteraceae	<i>B. trimera</i>	carqueja amarga	partes aéreas	001668	UEC 184154	0,05
	<i>T. minuta</i>	cravo de defunto	partes aéreas	1314	CPMA**** 10450	0,1
Boraginaceae	<i>C. curassavica</i>	erva-baleeira	partes aéreas	0717/05209/F	UEC 112744	1
Lamiaceae	<i>M. pulegium</i>	poejo	partes aéreas da floração	001839	UEC 121402	0,3
Myrtaceae	<i>E. uniflora</i>	pitanga	folhas	002178	UEC 184186	0,3
Rutaceae	<i>R. graveolens</i>	arruda	partes aéreas da floração	001696	CPMA 376	1,4

*Comercial: óleos essenciais adquiridos nas empresas Laszlo Aromaterapia Ltda. ou Quinari Fragâncias e Cosméticos Ltda.;

Ex-situ": óleos essenciais adquiridos a partir do banco de germoplasma da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA) do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas –UNICAMP; *UEC: voucher da espécie depositada no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC) - Instituto de Biologia, UNICAMP; ****CPMA: voucher da espécie depositada no Herbário da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA), UNICAMP.

Fonte: Elaboração própria.

Micro-organismos e condições de crescimento

O inóculo polimicrobiano foi obtido a partir da saliva de voluntários, para mimetizar o biofilme formado *in vivo*²⁵. O uso da saliva para obtenção do inóculo polimicrobiano foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos local (CAAE: 51909615.0.0000.5416) (ANEXO B). Para a obtenção de uma amostra representativa, foi coletada 10 mL de saliva estimulada de doze voluntários²⁷ em jejum, que permaneceram por 24 h sem escovar os dentes e que não utilizaram antibióticos ou antifúngicos nos últimos seis meses²⁸. Os voluntários possuíam de 21 a 27 anos de idade, sendo três do sexo masculino e nove do sexo feminino. Todos são caucasianos e apresentavam boa saúde geral e bucal. As amostras de saliva coletadas foram combinadas²⁷, diluídas em glicerol (concentração final de 30%), distribuídas em tubos de 2 mL e estocadas a -80 °C.²⁹ Exterkate et al.²⁹ (2010) demonstraram não haver diferenças estatisticamente significante no biofilme formado quando se utiliza saliva fresca ou congelada. Para o cultivo desse inóculo, foi utilizado o meio de cultura proposto por McBain et al.³⁰ (2005), que é composto por mucina gástrica suína (2,5 g/L), peptona bacteriológica (2,0 g/L), triptona (2,0 g/L), extrato de levedura (1,0 g/L) NaCl, (0,35g/L), KCl (0,2 g/L), CaCl₂ (0,2 g/L), cloridrato de cisteína (0,1 g/L), hemina, (0,001 g/L) e vitamina K1 (0,0002 g/L), pH 7,0³⁰.

Alíquotas das amostras de saliva individual e combinada foram utilizadas para determinação da concentração de bactérias anaeróbias totais em ágar Wilkins-Chalgren³⁰, de estreptococos do grupo mutans em ágar Mitis Salivarius suplementado com 15% de sacarose e 0,2 UI/mL de bacitracina (MSBS)³¹ e de bactérias anaeróbias acidúricas em ágar BHI pH 4,7³². As placas de ágar Wilkins-Chalgren foram incubadas em anaerobiose (5-10% CO₂; <1% O₂; Anaerobac - Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda, Santa Cecília, SP, Brasil) a 37 °C por 48 h, as de MSBS foram incubadas em 5% CO₂ a 37 °C por 48 h e as placas de BHI pH 4,7 foram incubadas em anaerobiose a 37 °C por 96 h. O número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foram obtidos com o auxílio de contador de colônias (Phoenix Luferco CP 600 Plus, Araraquara – SP, Brasil). Os resultados foram expressos em Log (1+UFC/mL).

Para fins comparativos, também foi utilizado uma cepa de referência de reconhecida cariogenicidade, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, que foi cedida pelo Instituto Nacional Controle Qualidade em Saúde (INCQS) da

Fundação Oswaldo Cruz. Essa cepa foi armazenada a -20 °C em caldo BHI suplementado com 20% de glicerol. Culturas em ágar BHI desse micro-organismo foram utilizadas para obtenção de uma suspensão em solução salina contendo aproximadamente 10^7 UFC/mL, com o auxílio de um espectrofotômetro. As incubações foram realizadas a 37 °C em 5% CO₂ por 48 h³³. Para o cultivo dessa espécie, foi utilizado caldo BHI (avaliação da atividade antimicrobiana) ou caldo McBain (avaliação da interferência dos óleos essenciais na dinâmica de maturação de biofilmes).

Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi avaliada através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).

Os óleos essenciais foram diluídos em Tween 80 e meio de cultura na proporção 1:1:8 (v/v). Como controle negativo, foi utilizado o diluente do óleo essencial (Tween 80) na mesma proporção. Para fins comparativos da atividade antimicrobiana, foi utilizado um produto comercial (Periogard®; digluconato de clorexidina 0,12%).

Foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo baseada no Clinical and Laboratory Standards Institute³⁴, com modificações^{30,33}, tendo em vista que o CLSI não contempla o estudo de microaerófilos e de inóculo polimicrobiano. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Nos poços da primeira coluna da placa de 96 poços, foram inseridos 100 µL dos óleos essenciais diluídos. Para o digluconato de clorexidina 0,12%, foram inseridos 50 µL do produto comercial e 50 µL de meio de cultura duas vezes concentrado (caldo McBain com 1% de sacarose para inóculo polimicrobiano e caldo BHI para *S. mutans*). Diluições seriadas de razão dois foram obtidas de modo a serem testadas concentrações entre 0,1 µL/mL e 100 µL/mL (v/v) dos óleos essenciais e entre 0,0006 e 0,6 µL/mL (v/v) do digluconato de clorexidina. Em seguida, o inóculo polimicrobiano ou a suspensão de *S. mutans* foi adicionado, de forma a obter uma concentração final de aproximadamente 10^5 UFC/mL de bactérias.³⁴ As placas contendo as suspensões de *S. mutans* foram incubadas em 5% CO₂ e as placas contendo o inóculo polimicrobiano foram incubadas em anaerobiose e ambas por 24 h a 37 °C. Em seguida, os poços

foram submetidos a uma subcultura em ágar BHI e incubados por 24 h. A avaliação da presença de crescimento bacteriano foi realizada através de inspeção visual. A CIM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento e a CBM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir totalmente o crescimento microbiano.

Os óleos essenciais que apresentaram valores de CIM $<25 \mu\text{L/mL}$ contra ambos os inóculos foram selecionados para as próximas etapas. Estudos pilotos demonstraram a impossibilidade de utilizar concentrações maiores do que esse valor na metodologia de avaliação da capacidade dos óleos essenciais em interferir na dinâmica da maturação de biofilmes.

Avaliação da capacidade dos óleos essenciais em interferir na maturação de biofilmes monotípicos e polimicrobianos

Biofilmes de *S. mutans* e biofilmes polimicrobianos cresceram na superfície de lamínulas de vidro ($\varnothing$ 13 mm; $n=12/\text{grupo}$) imersas em poços de placas de 24 poços por quatro dias, utilizando o modelo proposto por Albuquerque et al.²⁶ (2018).

Os óleos essenciais foram avaliados em concentração equivalente a 10 vezes a CIM.³⁵ Como controle negativo, foi utilizado o diluente do óleo essencial (Tween 80) na mesma proporção dos óleos essenciais. Para fins comparativos, foi utilizado um produto comercial (Periogard®; digluconato de clorexidina 0,12%).

As lamínulas esterilizadas foram posicionadas verticalmente, para criar um modelo de aderência ativa²⁹ dentro de placas de 24 poços, contendo 1,8 mL de caldo McBain suplementado com sacarose (0,2% de sacarose para biofilmes de *S. mutans* e 0,5% para biofilmes polimicrobianos) e o inóculo de maneira a se obter uma concentração final de aproximadamente 10^5 UFC/mL (180 μL de inóculo *S. mutans* e 400 μL de inóculo polimicrobiano)³⁴. Após 6 h de incubação, as lamínulas foram lavadas por 10 s em NaCl 0,9% e transferidas para o meio de cultura sem sacarose.

Os tratamentos foram realizados uma vez ao dia no primeiro dia, após o período de fatura e duas vezes ao dia do segundo ao quarto dia de experimento, antes e após o período de fatura. As lamínulas foram lavadas por imersão em solução salina 0,9%. Em seguida, foram imersas em 2 mL nas soluções de

tratamento por 1 min, e lavadas novamente em solução salina 0,9%. A última exposição às substâncias foi realizada no quarto dia.

A acidogenicidade dos biofilmes foi aferida através da leitura do pH no meio de cultura antigo, após sua troca, utilizando um eletrodo específico acoplado a um analisador de íons (pHmetro Quimis, Diadema – SP, Brasil). Os dados de pH obtidos ao longo do tempo foram utilizados para calcular a área sob a curva e foram representados na forma de Área integrada (pH x tempo).

Após quatro dias, os biofilmes contendo os micro-organismos aderidos às lamínulas (n= 12/grupo) foram lavados em NaCl 0,9% e dispersos em banho de ultrassom. Parte das suspensões dos biofilmes (400 µL) de *S. mutans* e polimicrobiano foram diluídas, semeadas e incubadas de acordo com as condições descritas anteriormente. O número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foi obtido com o auxílio de um contador de colônias. Os resultados foram expressos em log (1+ UFC/mL). O restante das suspensões foi utilizado na análise da composição bioquímica do biofilme.

Quantificação de peso seco e de polissacarídeos extracelulares insolúveis em água (PI) na matriz do biofilme

As suspensões dos biofilmes (1,6 mL de cada amostra) foram combinadas em tubo falcon (4 tubos falcon, contendo as suspensões de 3 amostras) e centrifugadas (10.000 ×g por 10 min a 4 °C) (Centrífuga Refrigerada 5810r, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado em 5 mL de água mili-Q³⁶⁻³⁸. A centrifugação e lavagem com água mili-Q foi repetida duas vezes. O precipitado foi seco em um concentrador de amostras (Speed Vac Concentrator RVC 2–18 CD Plus, Christ) por 3 h e o peso seco foi obtido (mg).

Para extração dos PI, 0,3 mL de NaOH 1 M / mg de peso seco foram adicionados a tubos contendo o precipitado seco. Os tubos foram homogeneizados em um agitador de tubos (AP56, Phoenix, Piracicaba, SP, Brasil) e agitados a 37 °C (Quimis, Diadema, SP, Brasil). Após 10 min, os precipitados foram novamente homogeneizados e agitados a 37 °C. Após 30 min, esse procedimento foi repetido e o precipitado foi agitado a 37 °C por mais 2 h. As amostras foram centrifugadas (10.000 ×g por 10 min a 4 °C) e os sobrenadantes contendo os polissacarídeos foram removidos. A centrifugação

foi repetida duas vezes. Os sobrenadantes foram armazenados em -20 °C por 16 h.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas novamente e o sobrenadante foi descartado. Os precipitados foram lavados em 7 mL de etanol 95% (volume correspondente a 3 vezes o volume de NaOH) com o auxílio de uma alça de inoculação esterilizada para remover possíveis amostras da parede dos tubos e centrifugados novamente. A lavagem foi repetida duas vezes. Após a última lavagem, as amostras foram resuspensas 3 vezes em 1 mL de NaOH.

A quantidade total de polissacarídeos insolúveis foi determinada nos sobrenadantes pelo método fenol-sulfúrico, utilizando glicose como padrão³⁹. Uma curva de glicose foi realizada, utilizando concentrações de 0 a 25 µg. O coeficiente de correlação e o Slope obtidos foram 0,99 e 0,051, respectivamente. A absorbância das amostras foi avaliada através de um espectrofotômetro a 490 nm (Biotek Elx800, Winooski, Vermont, EUA). Os resultados foram expressos em µg de polissacarídeos por mg peso seco do biofilme.

Avaliação da citotoxicidade

Células HDFn (fibroblasto dérmico humano, neonatal, número de catálogo C0045C, Gibco – Thermo Fischer, Waltham, Massachusetts, EUA) e HaCaT (queratinócitos epidérmicos humanos, número de catálogo 0341 do Banco de Células do Rio de Janeiro) foram cultivadas continuamente em frascos de cultivo celular de 75 cm² e mantidas em estufa incubadora a 37 °C em 5% de CO₂ (MCO-17AC, Sanyo Electric Co. Ltd., Osaka, Japão). O meio de cultura DMEM (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco, Dulbecco's Modified Eagle's Medium Cultilab, Campinas, SP) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP) foi renovado em um intervalo de 48 a 72 h.

Os óleos essenciais foram diluídos inicialmente em propilenoglicol e meio de cultura sem fenol vermelho na proporção 1:1:8 (v/v). Os óleos essenciais foram posteriormente diluídos em DMEM de modo a se obter concentrações de 1,25, 12,5, 25, 50 µL/mL (v/v). DMEM contendo 5% de propilenoglicol foi utilizado como controle negativo. DMEM suplementado com 10% de SFB foi utilizado como controle de crescimento. Digluconato de clorexidina 0,12% foi utilizado para fins comparativos. As células foram tripsinizadas após atingirem 80% de confluência. Uma suspensão contendo 5×10^4 células/mL foi semeada em

placas de 96 poços e incubada por 24 h em 5% de CO₂.⁴⁰ Em seguida, o meio de cultura foi renovado e as células foram tratadas com os óleos essenciais e os controles por 5 min.

Após esse intervalo, a viabilidade celular foi avaliada, utilizando o ensaio de MTT, uma metodologia colorimétrica indireta que avalia o metabolismo mitocondrial pela conversão do sal de tetrazólio (cor amarela) em formazan (azulado) por enzimas da mitocôndria.⁴¹ Para isso, o meio de cultura foi removido e foram adicionados 100 µL de DMEM sem SFB e sem fenol vermelho com 10% de MTT (5 mg/mL, Sigma Aldrich). Após 3 h, a suspensão foi removida, 100 µL de DMSO foram adicionados e a absorbância foi lida em 570 nm e 690 nm, como indicado pelo fabricante.⁴² Os experimentos foram realizados em triplicata e a porcentagem de viabilidade celular foi calculada considerando-se o controle negativo como 100% de viabilidade.

Análise dos dados

Os resultados da análise de micro-organismos na saliva e dos testes de CIM e CBM foram analisados descritivamente. Os demais dados foram analisados com o programa GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). O nível de significância foi estabelecido em 5%. Os dados de viabilidade microbiana nos biofilmes ($p \geq 0,0504$) acidogenicidade ($p \geq 0,1485$) e citotoxicidade ($p \geq 0,1558$) apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e foram avaliados através da Análise de Variância (ANOVA) a um fator, seguido de teste de post hoc de Tukey.

A comparação da viabilidade microbiana entre biofilmes monotípicos de *S. mutans* e biofilmes polimicrobianos foi avaliada através do teste t Student. Para biofilmes polimicrobianos, utilizou-se o grupo de estreptococos do grupo mutans.

A comparação da acidogenicidade dos biofilmes de *S. mutans* com a de biofilmes polimicrobianos também foi avaliada por meio do teste t Student. Os dados referentes ao peso seco ($p \leq 0,0121$) e quantidade de polissacarídeos insolúveis ($p \leq 0,0115$) não apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk). Para eles, foi utilizado o teste de Kurskal-Wallis, seguido de teste pos hoc de Dunn. Foi utilizado o teste de Mann-whitney para comparar os dados de peso

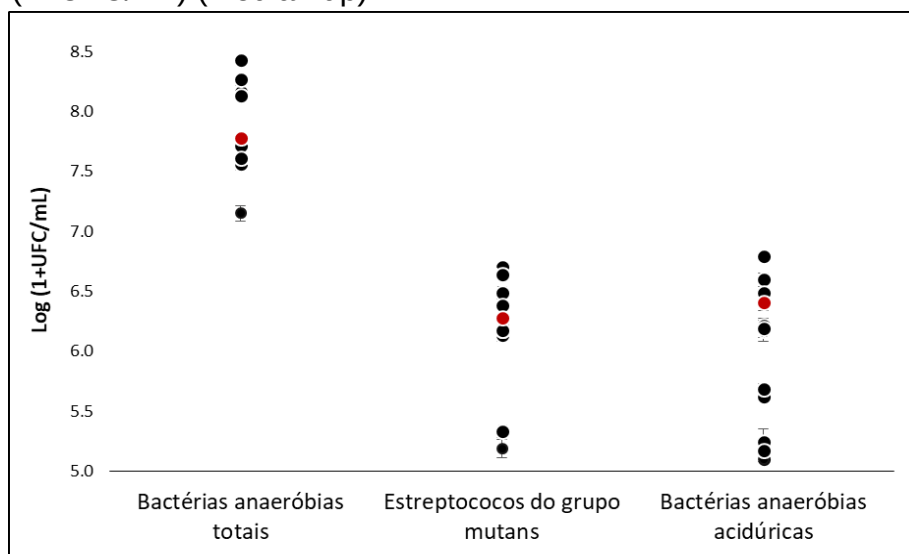
seco e de polissacarídeos insolúveis quantificados em biofilmes de *S. mutans* com os dados quantificados em biofilmes polimicrobianos.

Foi utilizado o teste de correlação de Spearman para avaliar se há correlação entre as variáveis estudadas (viabilidade microbiana, acidogenicidade, concentração de polissacarídeos insolúveis e peso seco), dentro de cada grupo de tratamento, tanto para biofilmes de *S. mutans*, quanto para biofilmes polimicrobianos e também para avaliar se há correlação entre biofilmes de *S. mutans* e polimicrobiano para todas as variáveis estudadas, dentro de cada grupo de tratamento.

Resultados

A média ($\pm dp$) das concentrações de bactérias anaeróbias totais, estreptococos do grupo mutans e bactérias anaeróbias acidúricas presentes nas amostras de saliva combinada foi de 7,78 (0,03), 6,28 (0,05) e 6,41 (0,07) log (1+UFC/mL), respectivamente. A média ($\pm dp$) das concentrações dos mesmos grupos microbianos nas amostras de saliva dos 12 voluntários foram de 7,79 (0,37), 6,15 (0,45) e 5,87 (0,60) log (1+UFC/mL), respectivamente. Esses resultados demonstram que valores de viabilidade microbiana na saliva combinada foram próximos à média dos valores de viabilidade microbiana na saliva dos 12 voluntários. A variabilidade entre os voluntários dentro de um mesmo grupo microbiano foi de até 1,28, 1,52 e 1,69 log (1+UFC/mL), para bactérias anaeróbias totais, estreptococos do grupo mutans e bactérias anaeróbias acidúricas (Figura 1).

Figura 1- Concentração inicial de micro-organismos presentes na amostra de saliva dos 12 voluntários individualmente (pontos pretos) e combinada (ponto vermelho), expressos em log (1+UFC/mL) (média $\pm$ dp).



Fonte: Elaboração própria.

Das 14 amostras de óleos essenciais analisadas, nove apresentaram CIM ≤ 100 μ L/mL contra *S. mutans* e cinco contra inóculo polimicrobiano. Ainda, quatro óleos essenciais apresentaram CBM ≤ 100 μ L/mL contra *S. mutans* e dois contra inóculo polimicrobiano. Os óleos de *E. uniflora* de ambas as fontes, *M. pulegium* da Fonte comercial e *T. minuta* da Fonte ex-situ apresentaram CIM contra *S. mutans* e inóculo polimicrobiano. O inóculo polimicrobiano apresentou valores de CIM dos óleos essenciais até 16 vezes maiores do que os valores observados para *S. mutans*. Em relação a CHX, o inóculo polimicrobiano apresentou valor de CIM 5 vezes maior que o *S. mutans*. A Fonte comercial apresentou os menores valores de CIM e CBM em um maior número de vezes em comparação com a Fonte ex-situ (Tabela 2).

Com base nos resultados encontrados e com o critério estabelecido (apresentar CIM < 25 μ L/ml), o óleo essencial de *E. uniflora* de ambas as fontes foi selecionado para a realização dos testes em biofilmes.

Tabela 2- Valores de CIM e CBM ($\mu\text{L/mL}$) das substâncias estudadas.

Óleos essenciais	<i>S. mutans</i>				Polimicrobiano			
	Fonte comercial		Fonte ex-situ		Fonte comercial		Fonte ex-situ	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>Baccharis trimera</i>	6,25	>100	1,56	100	100	> 100	> 100	> 100
<i>Cordia curassavica</i>	6,25	100	12,5	>100	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>Eugenia uniflora</i>	1,56	100	12,5	>100	6,25	> 100	12,5	25
<i>Foeniculum vulgare</i>	>100	>100	>100	>100	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>Mentha pulegium</i>	50	100	> 100	> 100	100	100	> 100	> 100
<i>Ruta graveolens</i>	>100	> 100	100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>Tagetes minuta</i>	> 100	> 100	25	>100	> 100	> 100	12,5	> 100
Digluconato de clorexidina 0,12%	0,002	0,005	-	-	0,01	0,08	-	-

Fonte comercial: óleos essenciais adquiridos nas empresas Laszlo Aromaterapia Ltda. ou Quinari Fragâncias e Cosméticos Ltda.; Fonte ex-situ: óleos essenciais adquiridos a partir do banco de germoplasma da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA) do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas –UNICAMP

Fonte: Elaboração própria.

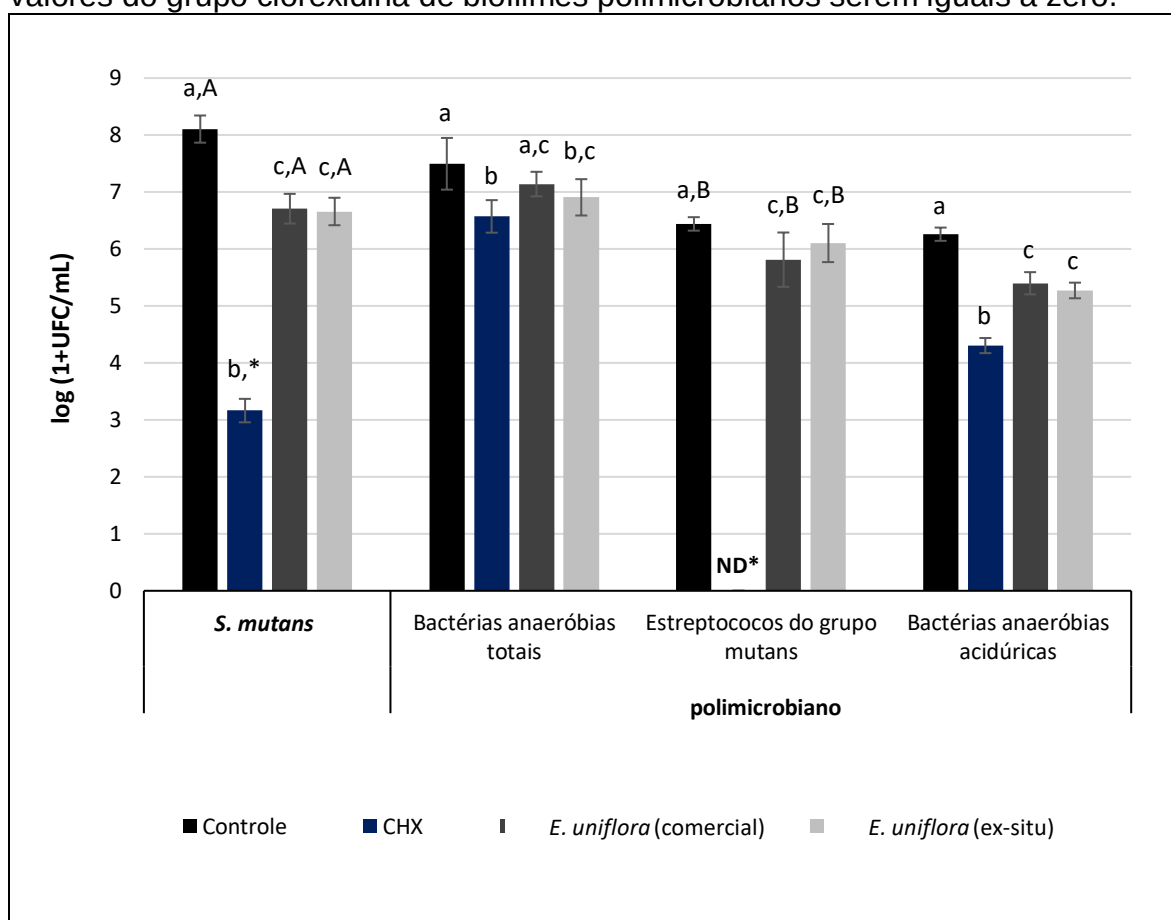
Biofilmes de *S. mutans* tratados com os óleos essenciais apresentaram viabilidade microbiana estatisticamente menor em relação ao controle ($p < 0,05$) e estatisticamente maior em relação a CHX ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o óleo essencial de *E. uniflora* da Fonte comercial e o óleo essencial de *E. uniflora* da Fonte ex-situ ($p = 0,9627$) (Figura 2).

Biofilmes polimicrobianos tratados com os óleos essenciais apresentaram viabilidade microbiana estatisticamente menor em relação ao controle para os grupos microbianos estreptococos do grupo mutans e bactérias anaeróbias acidúricas ($p < 0,05$) e estatisticamente maior em relação a CHX para os mesmos grupos microbianos ($p < 0,05$). Não foram detectados estreptococos do grupo mutans no grupo CHX. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o óleo essencial de *E. uniflora* da Fonte comercial e o óleo essencial de *E. uniflora* da Fonte ex-situ para todos os grupos microbianos ($p > 0,05$). Entretanto, a viabilidade de bactérias anaeróbias totais dos biofilmes tratados com o óleo essencial de *E. uniflora* da Fonte ex-situ foi estatisticamente semelhante à CHX ($p = 0,0869$) (Figura 2).

A viabilidade microbiana de *S. mutans* em biofilmes monotípicos foi estatisticamente maior do que a viabilidade de estreptococos do grupo mutans

em biofilmes polimicrobianos para todos os tratamentos ($p \leq 0,0004$). A log redução em biofilmes de *S. mutans* variou de 1,40 a 4,94. A log redução em biofilmes polimicrobianos de bactérias anaeróbias totais, estreptococos do grupo mutans e de bactérias anaeróbias acidúricas variaram de 0,36 a 0,92, de 0,34 a 6,44 e de 0,86 a 1,95, respectivamente (Figura 2).

Figura 2- Viabilidade microbiana nos biofilmes de *S. mutans* e polimicrobianos após tratamento (média $\pm$ dp) com os óleos essenciais na concentração 10 vezes a CIM ($n=12$). CHX: digluconato de clorexidina 0,12%. Letras minúsculas demonstram diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA a um fator, seguido de teste post hoc de Tukey, $p < 0,05$). Letras maiúsculas demonstram diferenças entre biofilme de *S. mutans* e polimicrobiano (estreptococos do grupo mutans) (t Student, $p < 0,05$). ND: níveis não detectáveis. *Não foi possível realizar análise estatística pelos valores do grupo clorexidina de biofilmes polimicrobianos serem iguais a zero.

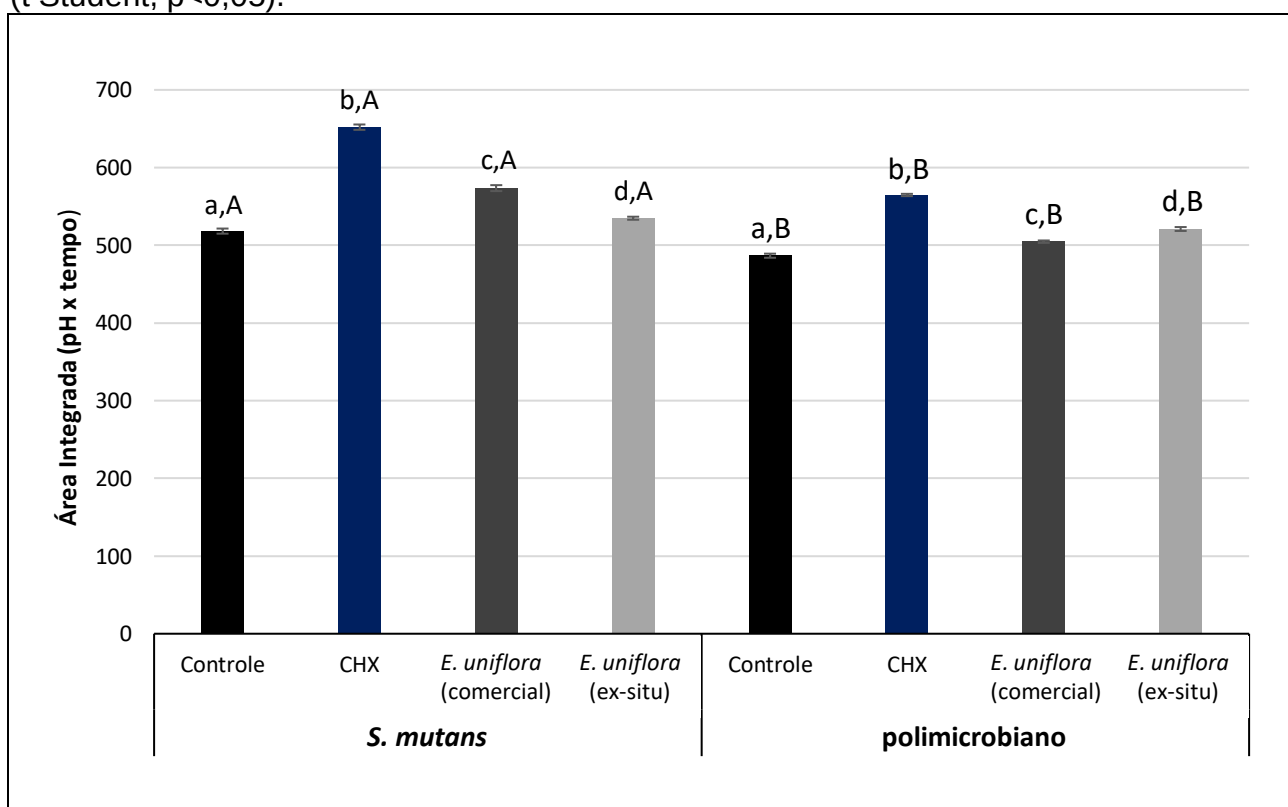


Fonte: Elaboração própria.

A área integrada (pH x tempo) representa o desempenho global dos tratamentos durante todo o experimento. Como seu valor foi calculado a partir da área sob a curva, a acidogenicidade dos biofilmes submetidos aos tratamentos é inversamente proporcional aos valores obtidos. Biofilmes de *S.*

mutans e polimicrobianos tratados com os óleos essenciais apresentaram acidogenicidade estatisticamente menor em relação ao controle ($p < 0,05$) e estatisticamente maior em relação à CHX ($p < 0,05$). Os biofilmes tratados com o óleo essencial de *E. uniflora* da Fonte ex-situ apresentou maior acidogenicidade do que o óleo de *E. uniflora* da Fonte comercial para biofilmes de *S. mutans*. Para biofilmes polimicrobianos, o óleo essencial da Fonte ex-situ apresentou menor acidogenicidade do que o óleo da Fonte comercial. A acidogenicidade dos biofilmes de *S. mutans* ($p < 0,0001$) foi estatisticamente menor do que de biofilmes polimicrobianos (Figura 3).

Figura 3- Área integrada (pH x tempo) (média $\pm$ dp) da acidogenicidade dos biofilmes de *S. mutans* e polimicrobianos de acordo com o grupo de tratamento (n=12). CHX: digluconato de clorexidina 0,12% Letras minúsculas distintas demonstram diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA a um fator, seguido de teste post hoc de Tukey, $p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas demonstram diferenças entre biofilme de *S. mutans* e polimicrobiano (t Student, $p < 0,05$).



Fonte: Elaboração própria.

Não foi possível quantificar a concentração de polissacarídeos insolúveis do grupo CHX tanto para os biofilmes de *S. mutans* quanto para os biofilmes polimicrobianos. O grupo *E. uniflora* (Fonte ex-situ) apresentou concentração de

polissacarídeos insolúveis estatisticamente menor em relação ao grupo controle em ambas condições de crescimento (biofilmes monotípicos ou polimicrobiano) ($p < 0,0001$). Para o peso seco de biofilmes monotípicos, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados com os óleos essenciais e o grupo CHX ($p \geq 0,058$). Para o peso seco de biofilmes polimicrobianos, somente o grupo *E. uniflora* (Fonte ex-situ) foi estatisticamente semelhante a CHX ($p = 0,21$).

Biofilmes polimicrobianos apresentaram concentração estatisticamente maior de polissacarídeos insolúveis em todos os grupos de tratamento que os biofilmes monotípicos. O peso seco dos biofilmes polimicrobianos foi estatisticamente maior que biofilmes monotípicos para todos os tratamentos, exceto para a CHX, que apresentou peso seco estatisticamente menor.

Tabela 3- Média ($\pm dp$) de polissacarídeos insolúveis (PI) (μg /peso seco) e peso seco (mg)

Tratamentos	Biofilme de <i>S. mutans</i>		Biofilme polimicrobiano	
	PI	Peso seco	PI	Peso seco
Controle	2,65 (1,26) ^{aA}	2,11 (0,43) ^{aA}	7,93 (0,23) ^{aB}	3,08 (0,05) ^{aB}
CHX	nq*	0,42 (0,05) ^{bA}	nq*	0,15 (0,08) ^{bB}
<i>E. uniflora</i> (comercial)	2,11 (0,25) ^{aA}	0,51 (0,19) ^{bA}	7,50 (0,11) ^{bB}	5,42 (2,56) ^{aB}
<i>E. uniflora</i> (ex-situ)	0,28 (0,19) ^{bA}	0,50 (0,06) ^{bA}	5,63 (0,24) ^{cB}	2,07 (0,36) ^{bB}

Letras distintas demonstram diferenças estatísticas entre os grupos. Letras minúsculas distintas correspondem as diferentes estatísticas entre os tratamentos dentro de um mesmo tipo de biofilme (Kruskal-Wallis, seguido de post hoc de Dunn, $p < 0,05$). Letras maiúsculas distintas correspondem as diferenças estatísticas entre biofilme de *S. mutans* e biofilme polimicrobiano (Mann-Whitney, $p < 0,05$). *nq: não quantificável. CHX: digluconato de clorexidina 0,12%. Comercial: óleos essenciais adquiridos nas empresas Laszlo Aromaterapia Ltda. ou Quinari Fragâncias e Cosméticos Ltda.; ex-situ: óleos essenciais adquiridos a partir do banco de germoplasma da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA) do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – UNICAMP.

Fonte: Elaboração própria.

Em culturas de fibroblastos, a CHX apresentou maior citotoxicidade do que todas as concentrações testadas dos óleos essenciais ($p \leq 0,0198$), exceto para concentrações 25 e 50 $\mu L/mL$ do óleo essencial de *E. uniflora* da Fonte ex-

situ ($p=0,99$) (Figura 4A). Em culturas de queratinócitos, a CHX apresentou maior citotoxicidade que todas as concentrações testadas de ambos os óleos essenciais ($p\leq 0,0002$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na viabilidade celular de queratinócitos entre as Fontes comercial e ex-situ dentro de uma mesma concentração (Figura 4B). Foi observada uma relação dose-resposta muito forte na citotoxicidade para as diferentes concentrações dos óleos essenciais de *E. uniflora* tanto em culturas de fibroblastos (Fonte comercial: $r^2=-0,98$; Fonte ex-situ: $r^2=-0,79$) como em culturas de queratinócitos (Fonte comercial: $r^2=-0,96$; Fonte ex-situ: $r^2=-0,88$).

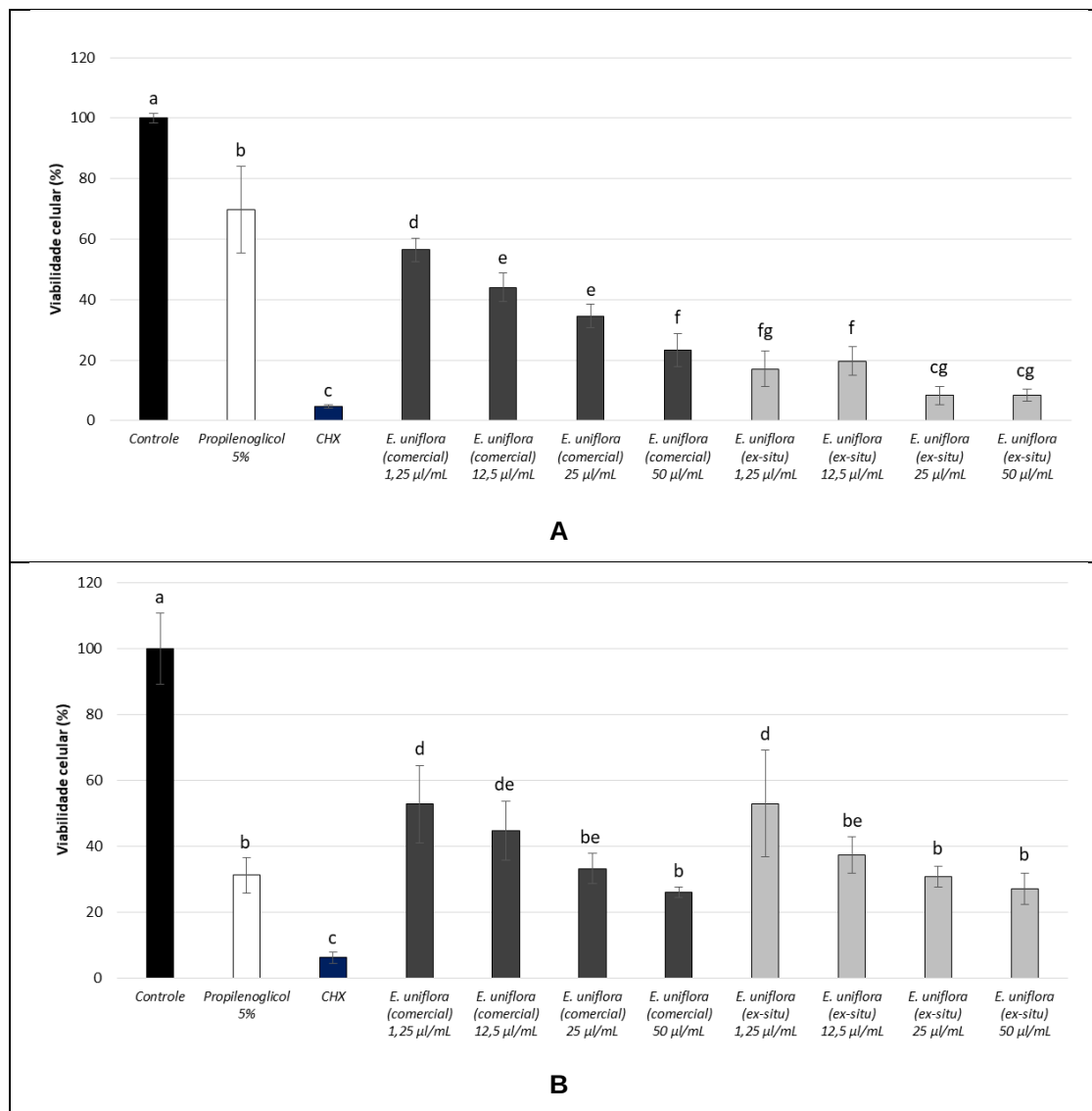


Figura 4- Porcentagem de viabilidade celular (média±dp) de cultura de fibroblastos (A) e queratinócitos (B), após 5 min de tratamento com os óleos essenciais de *E. uniflora* de ambas as fontes em diferentes concentrações (1,25, 12,5, 25 e 50 µL/mL) e do digluconato de clorexidina 0,12% (CHX). Letras distintas demonstram diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA a um fator, seguido de pós-teste de Tukey $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Não houve correlação entre as variáveis estudadas (viabilidade microbiana, acidogenicidade, concentração de polissacarídeos insolúveis e peso seco), dentro de cada grupo de tratamento, tanto para biofilmes de *S. mutans*, quanto para biofilmes polimicrobianos ($p>0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4- Correlação entre as variáveis estudadas para cada grupo de tratamento dentro de cada tipo de biofilme.

Variáveis	<i>S. mutans</i> r ² (p)				Polimicrobiano r ² (p)			
	Controle	CHX	comercial	ex-situ	Controle	CHX	comercial	ex-situ
log (1+UFC/mL) x pH	0,86 (0,33)	0,25 (0,4251)	0,44 (0,1567)	0,12 (0,7081)	0,21 (0,5221)	*	0,26 (0,4059)	0,44 (0,1476)
log (1+UFC/mL) x PI	0,5 (1,00)	**	1,00 (0,33)	0,86 (0,33)	0,50 (1,00)	* **	1,00 (0,33)	1,00 (0,33)
log (1+UFC/mL) x peso seco	0,5 (1,00)	0,00 (1,00)	0,00 (1,00)	0,86 (0,33)	0,50 (1,00)	*	0,50 (1,00)	0,50 (1,00)
pH x PI	1 (0,33)	**	1,00 (0,33)	0,50 (1,00)	1,00 (0,33)	**	0,50 (1,00)	0,50 (1,00)
pH x peso seco	1 (0,33)	0,00 (1,00)	0,50 (1,00)	0,50 (1,00)	1,00 (0,33)	0,50 (1,00)	0,50 (1,00)	1,00 (0,33)
PI x peso seco	1 (0,33)	**	0,50 (1,00)	0,86 (0,33)	1,00 (0,33)	**	0,50 (1,00)	0,50 (1,00)

Valores de $p > 0,05$ indicam que não há correlação entre as variáveis (teste de correlação de Spearman, $p < 0,05$). CHX: digluconato de clorexidina 0,12%. PI: polissacarídeos insolúveis. Comercial: óleos essenciais adquiridos nas empresas Laszlo Aromaterapia Ltda. ou Quinari Fragâncias e Cosméticos Ltda.; ex-situ: óleos essenciais adquiridos a partir do banco de germoplasma da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA) do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas –UNICAMP. *Não foi possível realizar análise estatística pelos valores de viabilidade de estreptococos do grupo mutans do grupo CHX em biofilmes polimicrobianos serem iguais a zero. **Não foi possível realizar análise estatística pelos valores obtidos de PI do grupo CHX em ambos os biofilmes não serem quantificáveis (abaixo do nível de detecção).

Fonte: Elaboração própria

Não houve correlação entre biofilmes de *S. mutans* e polimicrobiano para todas as variáveis estudadas (viabilidade microbiana, acidogenicidade, concentração de polissacarídeos insolúveis e peso seco), dentro de cada grupo de tratamento, ($p > 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5- Correlação entre os biofilmes de *S. mutans* e polimicrobiano dentro de cada variável estudada.

	S. mutans x polimicrobiano $ r^2 $ (p)			
	Controle	CHX	ex-situ	comercial
log (1+UFC/mL)	0,16 (0,6284)	*	0,29 (0,354)	0,19 (0,5497)
pH	0,55 (0,0626)	0,11 (0,7287)	0,01 (0,9635)	0,14 (0,6748)
PI	1,00 (0,33)	**	0,50 (1,00)	0,50 (1,00)
Peso seco	1,00 (0,33)	0,87 (0,33)	0,50 (1,00)	0,50 (1,00)

Valores de $p > 0,05$ indicam que não há correlação entre as variáveis (teste de correlação de Spearman, $p < 0,05$). CHX: digluconato de clorexidina 0,12%. PI: polissacarídeos insolúveis. Comercial: óleos essenciais adquiridos nas empresas Laszlo Aromaterapia Ltda. ou Quinari Fragâncias e Cosméticos Ltda.; ex-situ: óleos essenciais adquiridos a partir do banco de germoplasma da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA) do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas –UNICAMP. *Não foi possível realizar análise estatística pelos valores de viabilidade de estreptococos do grupo mutans do grupo CHX em biofilmes polimicrobianos serem iguais a zero. **Não foi possível realizar análise estatística pelos valores obtidos de PI do grupo CHX em ambos os biofilmes não serem quantificáveis (abaixo do nível de detecção).

Fonte: Elaboração própria

Discussão

O uso de óleos essenciais de plantas listadas na RENISUS para o controle do biofilme dentário é uma opção terapêutica promissora, já que produtos antimicrobianos disponíveis no mercado podem não ser eficazes ou causar efeitos colaterais. Esse estudo demonstrou a eficácia do óleo essencial de *E. uniflora* contra biofilmes monotípicos e polimicrobianos. Adicionalmente, os resultados demonstram que biofilmes polimicrobianos e monotípicos apresentam respostas diferentes a ação de agentes antimicrobianos.

Neste estudo, optamos por utilizar saliva combinada e congelada de 12 voluntários para a obtenção de inóculo e biofilme polimicrobiano. A variação na composição microbiana da saliva inter-indivíduo observada no presente estudo

está de acordo com o relatado anteriormente^{30,43,44}. McBain et al.³⁰ (2005) sugeriram que a combinação de saliva a partir de diferentes voluntários pode levar à criação de um inóculo instável e que o resultado final pode não ser representativo. Entretanto, mais recentemente, Kistler et al.⁴⁵ (2015) demonstraram, por meio de técnica moderna de sequenciamento molecular, que a combinação da saliva de ao menos seis indivíduos resulta no crescimento de um biofilme clinicamente representativo. O uso da saliva combinada e congelada no presente estudo teve como vantagens a coleta de um menor volume por voluntário, a diminuição do risco de perda do voluntário durante a execução do projeto, por desistência ou problemas de saúde, além da ausência de diferenças no biofilme formado quando se utiliza saliva fresca ou congelada, conforme demonstrado anteriormente por Exterkate et al.²⁹ (2010).

O uso de biofilmes monotípicos de *S. mutans* é muito comum em estudos de atividade antimicrobiana de produtos naturais²⁰⁻²³. No entanto, esse tipo de biofilme é menos representativo do ambiente oral e subestima a complexidade do biofilme dentário²⁹. O presente trabalho realizou um estudo comparativo do comportamento de biofilmes polimicrobianos e biofilmes monotípicos de *S. mutans*, abrangendo o estudo não apenas da viabilidade microbiana e da acidogenicidade dos biofilmes, mas também o estudo de outros importantes fatores de virulência do biofilme, como a análise da concentração de polissacarídeos insolúveis na matriz do biofilme e da biomassa formada, além da análise da CIM e CBM das suspensões microbianas.

De um modo geral, a viabilidade microbiana em biofilmes polimicrobianos foi menor do que em biofilmes monotípicos. Isso pode ser atribuído à menor taxa de crescimento de biofilmes polimicrobianos²⁹ e à existência de competição inter-espécie, que pode funcionar como uma barreira ecológica para o crescimento do biofilme e para o estabelecimento de estreptococos do grupo mutans. Em biofilmes polimicrobianos, estreptococos do grupo mutans se mostraram mais suscetíveis à CHX do que *S. mutans* em biofilmes monotípicos. Por outro lado, a log redução causada pelo tratamento com os óleos essenciais foi menor em biofilmes polimicrobianos do que em biofilmes monotípicos. Até o presente momento, não temos explicações para essa observação. Interessantemente, apesar de o tratamento com a CHX ter reduzido a viabilidade de estreptococos do grupo mutans a níveis não detectáveis, o mesmo não ocorreu com o grupo

de bactérias anaeróbias acidúricas. Esse dado demonstra a importância da avaliação de outros grupos microbianos que não apenas estreptococos do grupo mutans, o que está de acordo com a Teoria Ecológica Estendida da Cárie Dentária⁴⁶.

Adicionalmente, biofilmes polimicrobianos formaram um biofilme mais cariogênico (maior acidogenicidade, maior concentração de polissacarídeos insolúveis e maior peso seco dos biofilmes) em comparação a biofilmes monotípicos de *S. mutans*. É importante destacar que utilizamos uma menor concentração de sacarose para o crescimento de biofilmes monotípicos (0,2%) do que polimicrobiano (0,5%). Isso se deve pelo fato de estudos anteriores terem utilizado a concentração de 0,2% de sacarose para crescimento de biofilmes monotípicos^{29,47,48} e por essa concentração ter acarretado num crescimento satisfatório em estudos piloto (dados não mostrados). Adicionalmente, o uso da concentração de 0,5% de sacarose em biofilmes polimicrobianos foi estabelecido previamente²⁶.

Os resultados do presente estudo permitem considerar que o uso de biofilmes monotípicos pode superestimar a eficácia de alguns compostos antimicrobianos. Portanto, com o objetivo de prever com maior precisão a eficácia de agentes antimicrobianos, é possível recomendar o uso de biofilmes polimicrobianos nas avaliações in vitro. Estudos translacionais futuros devem ser realizados para apoiar a adoção definitiva de biofilmes polimicrobianos em estudo desse gênero.

Considerando todas as avaliações realizadas com o óleo essencial de *E. uniflora*, observa-se que as fontes de obtenção (comercial ou ex-situ) apresentaram resultados semelhantes em vários parâmetros. Portanto, os resultados do presente estudo corroboram com os achados da Publicação 2, no qual demonstramos que o uso de óleos essenciais obtidos a partir de fontes comerciais também é válido, desde que adquiridos em empresas especializadas.

E. uniflora já foi avaliada anteriormente contra micro-organismos cariogênicos (*S. mutans*, *S. sanguis* e *S. mitis*)^{18,19}. Entretanto, este é o primeiro estudo que avaliou a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais dessa espécie vegetal utilizando biofilmes polimicrobianos. A redução na concentração de estreptococos do grupo mutans e de bactérias anaeróbias acidúricas sinaliza uma capacidade dos óleos essenciais em manter a homeostase dos biofilmes

dentário ao invés de erradicar o biofilme. Esses achados estão de acordo com os resultados obtidos para a acidogenicidade dos biofilmes. Essa é considerada uma abordagem mais moderna na prevenção da cárie dentária e vai de encontro com a Teoria Ecológica Estendida da Cárie Dentária⁴⁶. É importante notar que o presente estudo também propõe uma forma simplificada de avaliação da acidogenicidade, através do cálculo da área sob a curva. Esse valor representa a acidogenicidade dos biofilmes durante todo o experimento, levando em consideração os valores de pH obtidos tanto no meio suplementado com sacarose quanto no meio sem suplementação. Por permitir uma avaliação global da acidogenicidade, recomenda-se a adoção desse cálculo em estudos futuros.

Tão importante quanto o controle de micro-organismos acidogênicos no biofilme dentário foi a capacidade dos óleos essenciais em reduzir a biomassa e a produção de polissacarídeos insolúveis, outros dois importantes fatores de virulência do biofilme. A redução da biomassa está relacionada à uma redução global no número de células (viáveis ou não) e na matriz extracelular. A redução na concentração de polissacarídeos insolúveis pode levar à perda de aderência e de estabilidade mecânica do biofilme, além de melhorar a ação de substâncias antimicrobianas^{49,50}. Estudos futuros devem ser realizados, a fim de investigar os mecanismos de ação do óleo essencial de *E. uniflora* nas células bacterianas e avaliar se o efeito desse óleo é refletido na prevenção de lesões de cárie clinicamente.

Como esperado, os óleos essenciais tiveram um desempenho menor do que o produto comercial (Periogard; CHX). Entretanto, é importante destacar que o Periogard apresenta álcool etílico e polisorbato 20 (estabilizante) (as concentrações não são informadas pelo fabricante) em sua composição, substâncias que potencializam a atividade antimicrobiana do produto. No entanto, enxaguatórios bucais que contenham álcool em sua composição devem ser evitados, visto que, além de ser contra-indicado para grávidas, lactantes, diabéticos, pacientes imunossuprimidos ou com mucosite⁵¹; pode aumentar o risco de desenvolvimento de câncer bucal^{52,53}.

A maior citotoxicidade demonstrada pelo grupo CHX e as diferenças encontradas entre os óleos essenciais e a CHX é um achado importante, uma vez que a CHX é produto comercializado amplamente utilizado na Odontologia. A citotoxicidade da CHX já foi relatada anteriormente por Garcia-Salinas et al.⁵⁴

(2018) com os mesmos tipos celulares incluídos no presente estudo e podem ter sido influenciados pela presença do álcool etílico, conforme demonstrado por Müller et al.⁵⁵ (2017). É importante notar que os óleos essenciais de *E. uniflora* de ambas as fontes apresentaram desempenho superior ou igual ao da CHX. No entanto, a viabilidade atingiu um máximo de 56%. Isso pode ser explicado pela utilização de cultura de células em monocamadas, o que não retrata a situação in vivo. Recomenda-se que a citotoxicidade dos óleos essenciais seja confirmada antes da realização de ensaios clínicos, utilizando modelos de epitélios humanos reconstituídos in vitro⁵⁶ e modelos de animais⁵⁷.

Conclusão

Conclui-se que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de plantas incluídas na RENISUS varia de acordo com a fonte de obtenção e tipo de inóculo. O óleo essencial de *E. uniflora* de ambas as fontes foram efetivos. O uso de biofilmes monotípicos pode superestimar a eficácia de agentes antimicrobianos, sendo indicado então, para estudos in vitro, o uso de biofilmes polimicrobianos.

Financiamento

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradecimentos

Nossos agradecimentos aos voluntários que doaram saliva, ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz por ter cedido a cepa utilizada nesse projeto e a CAPES pelo suporte financeiro.

Referências

1. Zanela NLM, Bijella MFTB, Rosa OPS. The influence of mouthrinses with antimicrobial solutions on the inhibition of dental plaque and on the levels of mutans streptococci in children. *Pesqui Odontol Bras.* 2002; 16(2): 101-6.

2. Van Strydonck DA, Slot DE, Van der Velden U, Van der Weijden F. Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2012; (11): 1042-55.
3. Balagopal S, Arjunker R. Chlorhexidine: the gold standard antiplaque agente. *J Pharm Sci Res*. 2013; 5(12): 270-4.
4. James P, Worthington HV, Parnell C, Harding M, Lamont T, Cheung A, et al. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017; 31(3): CD008676.
5. Saleem HG, Seers CA, Sabri AN, Reynolds EC. Dental plaque bacteria with reduced susceptibility to chlorhexidine are multidrug resistant. *BMC Microbiol*. 2016; 16:214. doi: 10.1186/s12866-016-0833-1.
6. Morrissey I, Oggioni MR, Knight D, Curiao T, Coque T, Kalkanci, A et al. Evaluation of epidemiological cut-off values indicates that biocide resistant subpopulations are uncommon in natural isolates of clinically-relevant microorganisms. *PLoS One*. 2014; 9(1): e86669.
7. Portal da Saúde [Internet]. Plantas de interesse ao SUS. 2015 [acesso em 2015 maio 15]. Disponível em: portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/465-sctie-raiz/daf-raiz/ceaf-sctie/fitoterapicos-cgafb/l1-fitoterapicos/12552-plantas-de-interesse-ao-sus.
8. Carvalho RS, Aleixo AA, Camargos VN, Santos M, Herrera KMS, Magalhães JT, et al. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de *Baccharis Trimeria* (Less.) Dc (Asteraceae) frente as bactérias de importância médica. *Biochem Biot Repor*. 2013; 2(2): 45-7.
9. Hernandez T, Canales M, Teran B, Avila O, Duran A, Garcia AM, et al. Antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Cordia curassavica* (Boraginaceae). *J Ethnopharmacol*. 2007; 111(1): 137-41.
10. Silva NC, Barbosa L, Seito LN, Fernandes A Jr. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. *Nat Prod Res*. 2012; 26(16): 1510-4.

11. Victoria FN, Lenardão EJ, Savegnago L, Perin G, Jacob RG, Alves D, et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: antioxidant and antimicrobial properties. *Food Chem Toxicol.* 2012; 50(8): 2668-74.
12. Esquivel-Ferriño PC, Favela-Hernández JM, Garza-González E, Waksman N, Ríos MY, del Rayo Camacho-Corona M. Antimycobacterial activity of constituents from *Foeniculum vulgare* var. dulce grown in Mexico. *Molecules.* 2012; 17(7): 8471-82.
13. Mahboubi M, Haghi G. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *J Ethnopharmacol.* 2008; 119(2): 325-7.
14. Haddouchi F, Chaouche TM, Zaouali Y, Ksouri R, Attou A, Benmansour A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. *Food Chem.* 2013; 141(1): 253-8.
15. Ibrahim AK. New terpenoids from *Mentha pulegium* L. and their antimicrobial activity. *Nat Prod Res.* 2013; 27(8): 691-6.
16. Shirazi MT, Gholami H, Kavosi G, Rowshan V, Tafsiry A. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Tagetes minuta* and *Ocimum basilicum* essential oils. *Food Sci Nutr.* 2014; 2(2): 146-55.
17. Igwaran A, Iweriebor BC, Ofuzim Okoh S, Nwodo UU, Obi LC, Okoh AI. Chemical constituents, antibacterial and antioxidant properties of the essential oil flower of *Tagetes minuta* grown in Cala community Eastern Cape, South Africa. *BMC Complement Altern Med.* 2017; 17(1): 351.
18. Galvão LC, Furletti VF, Bersan SM, da Cunha MG, Ruiz AL, de Carvalho JE, et al. Antimicrobial activity of essential oils against *Streptococcus mutans* and their antiproliferative effects. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012; 2012: 1-12.
19. Bersan SM, Galvão LC, Goes VF, Sartoratto A, Figueira GM, Rehder VL, et al. Action of essential oils from Brazilian native and exotic medicinal species on oral biofilms. *BMC Complement Altern Med.* 2014; 14: 451.

20. Pereira CA, Costa AC, Liporoni PC, Rego MA, Jorge AO. Antibacterial activity of *Baccharis dracunculifolia* in planktonic cultures and biofilms of *Streptococcus mutans*. J Infect Public Health. 2016; 9(3): 324-30.
21. Wiwattanarattanabut K, Choonharuangdej S, Srithavaj T. In vitro anti-cariogenic plaque effects of essential oils extracted from eulinary herbs. J Clin Diagn Res. 2017; 11(9): DC30-DC35.
22. Liu Y, Xu Y, Canção Q, Wang F, Sol L, Liu L, et al. Anti-biofilm Activities from *Bergenia crassifolia* Leaves against *Streptococcus mutans*. Front Microbiol. 2017; 8: 1738.
23. Akhalwaya S, van Vuuren S, Patel M. An in vitro investigation of indigenous South African medicinal plants used to treat oral infections. J Ethnopharmacol. 2018; 210: 359-71.
24. Wang Z, de la Fuente-Núñez C, Shen Y, Haapasalo M, Hancock RE. Treatment of Oral Multispecies Biofilms by an anti-biofilm peptide. PLoS One. 2015; 10(7): e0132512
25. Sissons CH. Artificial dental plaque biofilm model systems. Adv Dent Res. 1997; 11(1): 110-26.
26. Albuquerque YE, Danelon M, Salvador MJ, Koga-Ito CY, Botazzo Delbem AC, Ramirez-Rueda RY, et al. Mouthwash containing *Croton doctoris* essential oil: in vitro study using a validated model of caries induction. Future Microbiol. 2018; 13: 631-43
27. Edlund A, Yang Y, Hall AP, Guo L, Lux R, He X, et al. An in vitro biofilm model system maintaining a highly reproducible species and metabolic diversity approaching that of the human oral microbiome. Microbiome. 2013; 1(1): 25.
28. van de Sande FH, Azevedo MS, Lund RG, Huysmans MC, Cenci MS. An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. Biofouling. 2011; 27(9): 1057-63.
29. Exterkate RA, Crielaard W, ten Cate JM. Different response to amine fluoride by *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model. Caries Res. 2010; 44(4): 372–9.

30. McBain AJ, Sissons CH, Ledder RG, Sreenivasan PK, De Vizio W, Gilbert P. Development and characterization of a simple perfused oral microcosm. *J Appl Microbiol.* 2005; 98(3): 624–34.
31. Gold, OG, Jordan HV, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 1973; 18(11): 1357-64.
32. Azevedo MS, van de Sande FH, Maske TT, Signori C, Romano AR, Cenci MS. Correlation between the cariogenic response in biofilms generated from saliva of mother/child pairs. *Biofouling.* 2014; 30(8): 903-9.
33. Brighenti FL, Salvador MJ, Delbem ACB, Delben ACB, Oliveira MA, Soares CP, et al. Systematic screening of plant extracts from the brazilian pantanal with antimicrobial activity against bacteria with cariogenic relevance. *Caries Res.* 2014; 48(5): 353-60.
34. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 9th. Wayne: CLSI; 2012. [acesso em: 2018 Mar. 3]. Disponível em: <file:///C:/Users/Home/Downloads/03-CLSI-M07-A9-2012.pdf>
35. Oliveira MAC, Borges AC, Brighenti FL, Salvador MJ, Gontijo AVL, Koga-Ito CY. *Cymbopogon citratus* essential oil: effect on polymicrobial caries-related biofilm with low cytotoxicity. *Braz Oral Res.* 2017; 31: e89.
36. Dipersio JR, Mattingly SJ, Higgins ML, Shockman GD. Measurement of intracellular iodophilic polysaccharide in two cariogenic strains of *Streptococcus mutans* by cytochemical and chemical methods. *Infect Immun.* 1974; 10(3): 597–604.
37. Duarte S, Rosalen PL, Hayacibara MF, Cury JA, Bowen WH, Marquis RE, Rehder VL, Sartoratto A, Ikegaki M, Koo H. The influence of a novel propolis on *mutans streptococci* biofilms and caries development in rats. *Arch Oral Biol.* 2006; 51: 15-22.
38. Rocha GR, Florez Salamanca EJ, de Barros AL, Lobo CIV, Klein MI. Effect of tt-farnesol and myricetin on in vitro biofilm formed by *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *BMC Complement Altern Med.* 2018; 18(1): 61.

39. Dubois M, Gilles K, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*. 1951; 168: 167.
40. Kathirvel P, Ravi S. Chemical composition of the essential oil from basil (*Ocimum basilicum* Linn.) and its in vitro cytotoxicity against HeLa and HEP-2 human cancer cell lines and NIH 3T3 mouse embryonic fibroblasts. *Nat Prod Res*. 2012; 26(12): 1112-8.
41. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65 (1-2): 55-63.
42. In vitro toxicology assay kit MTT based. Sigma Aldrich. [acesso em: 2018 Mar. 3]. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/tox1bul.pdf>>.
43. Filoche SK, Soma D, van Bekkum M, and Sissons CH. Plaques from different individuals yield different microbiota responses to oral-antiseptic treatment. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008; 54(1): 27-36.
44. Fernandez y Mostajo M, Exterkate RAM, Buijs MJ, Crielaard W, Zaura E. Effect of mouthwashes on the composition and metabolic activity of oral biofilms grown in vitro. *Clin Oral Investig*. 2017; 21(4): 1221-30.
45. Kistler JO, Pesaro M, Wade WG. Development and pyrosequencing analysis of an in vitro oral biofilm model. *BMC Microbiol*. 2015; 15: 24.
46. Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res*. 2008; 42(6): 409-18.
47. Silva TC, Pereira AF, Exterkate RA, Bagnato VS, Buzalaf MA, Machado MA, Ten Cate JM, Crielaard W, Deng DM. Application of an active attachment model as a high-throughput demineralization biofilm model. *J Dent*. 2012; 40(1): 41-7.
48. Zhang M, He LB, Exterkate RA, Cheng L, Li JY, Ten Cate JM, Crielaard W, Deng DM. Biofilm layers affect the treatment outcomes of NaF and Nano-hydroxyapatite. *J Dent Res*. 2015; 94(4): 602-7.
49. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8(9): 623-33.

50. Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res*. 2013; 92(12): 1065-73.
51. Van Strydonck DA, Timmerman MF, van der Velden U, van der Weijden GA. Plaque inhibition of two commercially available chlorhexidine mouthrinses. *J Clin Periodontol*. 2005; 32(3): 305-9.
52. Lachenmeier DW. Safety evaluation of topical applications of ethanol on the skin and inside the oral cavity. *J Occup Med Toxicol*. 2008; 13(3): 26.
53. McCullough MJ, Farah CS. The role of alcohol in oral carcinogenesis with particular reference to alcohol-containing mouthwashes. *Aust Dent J*. 2008; 53(4): 302-6.
54. García-Salinas S, Elizondo-Castillo H, Arruebo M, Mendoza G, Irusta S. Evaluation of the antimicrobial activity and cytotoxicity of different components of natural origin present in essential oils. *Molecules*. 2018; 23(6): E1399.
55. Müller HD, Eick S, Moritz A, Lussi A, Gruber R. Cytotoxicity and antimicrobial activity of oral rinses in vitro. *Biomed Res Int*. 2017; 2017: 4019723.
56. Delben JA, Zago CE, Tyhovych N, Duarte S, Vergani CE. Effect of atmospheric-pressure cold Plasma on pathogenic oral biofilms and in vitro reconstituted oral epithelium. *PLoS One*. 2016; 11(5): e0155427.
57. Amuamuta A, Plengsuriyakarn T, Na-Bangchang K. Anticholangiocarcinoma activity and toxicity of the *Kaempferia galanga* Linn. Rhizome ethanolic extract. *BMC Complement Altern Med*. 2017; 17(1): 213.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que os óleos essenciais de plantas listadas na RENISUS podem apresentar potencial antimicrobiano para a elaboração de novos produtos anticariogênicos. O potencial antimicrobiano de 76% das plantas listadas na RENISUS ainda não foi investigado. Os óleos essenciais de *C. curassavica* (Fonte comercial) e *T. minuta* (Fonte ex-situ) apresentaram melhor atividade anti-aderente. O óleo essencial de *E. uniflora* de ambas as fontes demonstrou boa efetividade contra biofilmes monotípicos de *S. mutans* e polimicrobianos. Óleos essenciais obtidos de fonte comercial podem ser tão efetivos quanto os óleos obtidos de coleções ex-situ. O uso de biofilmes polimicrobianos é mais indicado para a avaliação da ação antimicrobiana de produtos naturais.

REFERÊNCIAS*

1. Federal Dental Association (FDI) [homepage da internet]. Genebra: FDI; c2018 [acesso em 27 abr. 2018]. Disponível em: <https://www.fdiworldddental.org/resources/world-health-assembly-statements/wha70-preparation-for-the-third-high-level-meeting-of-the>
2. Righolt AJ, Jevdjevic M, Marcenés W, Listl S. Global, regional, and country-level economic impacts of dental diseases in 2015. *J Dent Res*. 2018; 1: 22034517750572.
3. Paes Leme AF, Koo H, CM Bellato, Bedi G, Cury JÁ. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. *J Dent Res*. 2006; 85(10): 878-87.
4. Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. *Arch Oral Biol*. 1960; 1(4): 304-20.
5. Newbrum E. *Cariologia*. São Paulo: Santos; 1988.
6. Manji F, Ferjeskov O. Dental caries in developing countries in relation to the appropriate use of fluoride. *J Dent Res*. 1990; 69(Spec): 733-41.
7. Fejerskov O, Kidd E. *Cárie dentária. A doença e seu tratamento clínico*. 2nd ed. São Paulo: Santos; 2008.
8. Zijlstra V, van Leeuwen MB, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Harmsen HJ. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One*. 2010; 5(2): e9321.
9. Liu Y, Ren Z, Hwang G, Koo H. Therapeutic strategies targeting cariogenic biofilm microenvironment. *Adv Dent Res*. 2018; 29(1): 86-92.
10. Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res*. 2008; 42(6): 409-18.

*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

11. Zanela NLM, Bijella MFTB, Rosa OPS. The influence of mouthrinses with antimicrobial solutions on the inhibition of dental plaque and on the levels of mutans streptococci in children. *Pesqui Odontol Bras*. 2002; 16(2): 101-6.
12. Rugg-Gunn A. Dental caries: strategies to control this preventable disease. *Acta Med Acad*. 2013; 42: 117-30.
13. Braga AS, Pires JG, Magalhães AC. Effect of a mouthrinse containing *Malva sylvestris* on the viability and activity of microcosm biofilm and on enamel demineralization compared to known antimicrobials mouthrinses. *Biofouling*. 2018; 11: 1-10
14. American Dental Association (ADA) [homepage na internet]. Chicago: ADA; c2018 [acesso em 27 abr. 2018]. Disponível em: <http://www.mouthhealthy.org/en/az-topics/b/brushing-your-teeth>
15. Valkenburg C, Slot DE, Bakker EW, Van der Weijden FA. Does dentifrice use help to remove plaque? A systematic review. *J Clin Periodontol*. 2016; 43(12): 1050-8.
16. Voza I, Cavallè E, Corridore D, Ripari F, Spota A, Brugnoletti O, Guerra F. Preventive strategies in oral health for special needs patients. *Ann Stomatol (Roma)*. 2016; 126(3-4): 96-9.
17. ten Cate JM. The need for antibacterial approaches to improve caries control. *Adv Dent Res*. 2009; 21(1): 8-12.
18. Van Strydonck DA, Slot DE, Van der Velden U, Van der Weijden F. Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2012; 39(11): 1042-55.
19. Balagopal S, Arjankumar R. Chlorhexidine: the gold standard antiplaque agente. *J Pharm Sci Res*. 2013; 5(12): 270-4.
20. Karpiński TM, Szkaradkiewicz AK. Chlorhexidine-pharmaco-biological activity and application. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015; 19(7): 1321-6.
21. Roldán S, Herrera D, Santa-Cruz I, O'Connor A, González I, Sanz M. Comparative effects of different chlorhexidine mouth-rinse formulations on

volatile sulphur compounds and salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol*. 2004; 31(12): 1128-34.

22. Ribeiro LG, Hashizume LN, Maltz M. The effect of different formulations of chlorhexidine in reducing levels of mutans streptococci in the oral cavity: a systematic review of the literature. *J Dent*. 2007; 35(5): 359-70.

23. Vitkov L, Hermann A, Krautgartner WD, Hermann M, Fuchs K, Klappacher M, et al. Chlorhexidine-induced ultrastructural alterations in oral biofilm. *Microsc Res Tech*. 2005; 68(2): 85-9.

24. Zanata FB, Antoniazzi RP, Rosing CK. The effect of 0.12% chlorhexidine gluconate rinsing on previously plaque-free and plaque-covered surfaces: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2007; 78(11): 2127-34.

25. Hidalgo E, Dominguez C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. *Toxicol In Vitro*. 2001; 15(4-5): 271-6.

26. Faria G, Cardoso CR, Larson RE, Silva JS, Rossi MA. Chlorhexidine-induced apoptosis or necrosis in L929 fibroblasts: a role for endoplasmic reticulum stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009; 234(2): 256-65.

27. Carlin V, Matsumoto MA, Saraiva PP, Artioli A, Oshima CT, Ribeiro DA. Cytogenetic damage induced by mouthrinses formulations in vivo and in vitro. *Clin Oral Investig*. 2012; 16(3): 813-20.

28. James P, Worthington HV, Parnell C, Harding M, Lamont T, Cheung A, et al. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017; 3: CD008676.

29. Dias DA, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*. 2012; 2(2): 303-36.

30. Viegas Jr C, Bolzani VS. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quim Nova*. 2006; 29(2): 326-37.

31. Jeon JC, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural products in caries research: current (Limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Res*. 2011; 45(3): 243-63.

32. Montanari RM. Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e verbenaceae. [Dissertação de mestrado]. Viçosa: Universidade Federal; 2010.
33. Bezerra ANS, Silva LA, Batista CR, Serique RJB, Mourão RHV, Oliveira ECP. Avaliação do rendimento do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G. Meyer) em função do método de extração e do processamento da biomassa [Resumo]. In Anais da 62ª Reunião Annual do SBPC; 2010; Natal, RN [Anais eletrônicos]. UFRN; 2010 [acesso em 2018 out 31]. Disponível em: <http://www.sbpcnet.org.br/livro/62ra/resumos/resumos/3227.htm>
34. World Health Organization (WHO). Essential medicines and health products information portal: a World Health Organization resource. 2017 [acesso em 30 jul. 2018]. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jh2945e/2.2.html#Jh2945e.2.2>
35. Brasil. Decreto Federal no 5.813, de 22 de junho de 2006. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterapia [Internet]. [acesso em 2018 abr 3]. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-/2006/Decreto/D5813.htm.
36. Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápico. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.
37. Ministério da Saúde. RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS [Internet]. [acesso em 2017 mar 03]. Disponível em <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus>.
38. Castro RD, Oliveira JA, Vasconcelos LC, Maciel PP, Brasil VLM. Brazilian scientific production on herbal medicines used in dentistry. Rev Bras Pl Med. 2014; 16(3): 618-27.

ANEXO A – Cadastramento do projeto no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SisGen



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A93EDB1

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	A93EDB1
Usuário:	UNESP
CPF/CNPJ:	48.031.918/0001-24
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Baccharis trimera
Cordia curassavica
Eugenia uniflora
Foeniculum vulgare
Matricaria recutita
Mentha pulegium
Ruta graveolens
Tagetes minuta

Título da Atividade: **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais obtidos a partir de plantas incluídas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**

Equipe

Yasmin Etienne Albuquerque	Faculdade de odontologia de Araraquara - UNESP
Fernanda Lourenção Brighenti	Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

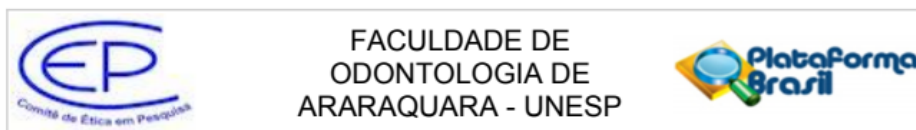
Parceiras Nacionais**48.031.918/0001-24 / UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO**Data do Cadastro: **17/09/2018 17:31:55**Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **10:50** de **22/10/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da atividade antimicrobiana e caracterização do perfil químico de óleos essenciais.

Pesquisador: Fernanda Lourenção Brighenti

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 51909615.0.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.476.491

Apresentação do Projeto:

O projeto "Avaliação da atividade antimicrobiana e caracterização do perfil químico de óleos essenciais obtidos a partir de plantas incluídas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS" foi devidamente apresentado.

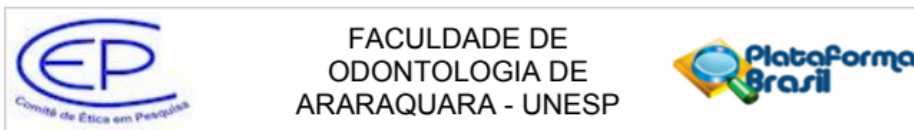
Objetivo da Pesquisa:

O objetivo desse trabalho será avaliar a atividade antimicrobiana e a composição química de óleos essenciais obtidos a partir de plantas incluídas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, analisando: 1) Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra suspensões de micro-organismos isolados e polimicrobiano; 2) A ação dos óleos essenciais na formação inicial de biofilmes monoespécie e polimicrobiano; 3) A capacidade dos óleos essenciais em interferir na dinâmica da maturação de biofilmes monoespécie e polimicrobiano; 4) Os componentes majoritários dos óleos essenciais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Descrição dos riscos inerentes ao pesquisador : Os químicos que apresentam maior risco à saúde são o ácido clorídrico e o cloreto de cálcio. O ácido clorídrico será manipulado somente em capela de exaustão, sempre sob supervisão da pesquisadora responsável. Para prevenir o risco de

Endereço: HUMAITA 1680
Bairro: CENTRO **CEP:** 14.801-903
UF: SP **Município:** ARARAQUARA
Telefone: (16)3301-6459 **E-mail:** cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.476.491

reação violenta com a água, o ácido será adicionado lentamente à água e o volume total de água somente será completado após o resfriamento da solução. Para o cloreto de cálcio, o uso de EPI – obrigatório para manipulação de químicos, será suficiente para controlar os riscos. Os meios de cultura (ágar BHI, Ágar Mitis Salivarius, Mucina tipo II, Peptona bacteriológica, Triptona, Extrato de levedura, Hemina) não são perigosos se forem seguidas as seguintes regras de controle de exposição e proteção individual: manusear de acordo com as boas práticas de higiene e segurança; lavar as mãos antes de interrupções, e no final do dia de trabalho; utilizar óculos de proteção testado e aprovado de acordo com as normas governamentais adequadas; manusear com luvas; utilizar jaleco de manga longa. Não é necessária proteção respiratória. Para Vitamina K1 e cloridrato de cisteína, o uso de máscara é obrigatório. Todos os participantes já receberam treinamento sobre boas práticas de laboratório. Descrição dos riscos inerentes à população: Os voluntários permanecerão 24 h sem higienização bucal. Esse período não irá trazer prejuízo para a saúde bucal dos pacientes, pois as doenças bucais relacionadas à falta de higiene – cárie e doença periodontal – possuem um aspecto crônico, ou seja, é necessária a abstenção durante um longo período de tempo (21 dias para a cárie dentária) para que os primeiros sinais da doença sejam observados clinicamente. Os voluntários poderão sentir desconforto por ficar esse período sem realizar a higienização bucal. Por isso, imediatamente após a coleta da saliva, os voluntários receberão uma profilaxia dental profissional. Os voluntários irão mascar um pedaço de uma película resistente à água para estimular a salivação. Esse material é flexível, inodoro, incolor, e inerte e não causa alergias. Há o risco de desconforto por excesso de mastigação. Para diminuir o risco desse desconforto, limitaremos o tempo da coleta em 2 minutos. Existe o risco de que a população, ao ter acesso aos resultados finais, passe a utilizar os óleos para tratamento de problemas dentários. Para evitar esse risco, será acrescentado ao relatório final um esclarecimento à população de que o produto ainda não está disponível para uso, de que extratos da planta ainda não devem ser utilizados para tratamento de problemas dentários e que o uso de qualquer formulação só deve ser realizado com orientação de um cirurgião dentista.

Benefícios: O projeto prevê a pesquisa de uma alternativa terapêutica inovadora com grande potencial para a geração de patente e base para fabricação de novos produtos. Os resultados obtidos pelo presente projeto gerarão informações importantes para o estabelecimento de programas preventivos focados nas populações mais suscetíveis, melhorando as políticas de saúde, um conceito que vai de encontro com as diretrizes do Sistema Único de Saúde (SUS). Podem também trazer novas alternativas mais eficazes, menos tóxicas e menos onerosas na prevenção da cárie dentária seguramente trazendo benefícios diretos à comunidade.

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

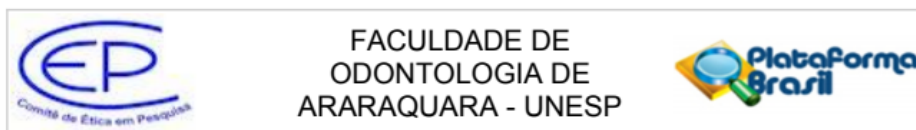
CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.476.491

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto trará contribuição para a área ao qual se aplica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram devidamente apresentados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as solicitações foram atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Atendidas pendências de reunião, considero APROVADO o protocolo.

O pesquisador deverá encaminhar relatórios parciais a cada 01 (um) ano até o prazo final da pesquisa, quando deverá encaminhar o relatório final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_555951.pdf	23/03/2016 19:44:39		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termodeconsentimento.doc	23/03/2016 19:44:09	Yasmin Etienne Albuquerque	Aceito
Outros	Respostaoparecer.docx	20/02/2016 15:49:12	Yasmin Etienne Albuquerque	Aceito
Outros	Descricaodosriscosassociadosapesquisa.docx	20/02/2016 15:46:28	Yasmin Etienne Albuquerque	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	20/02/2016 15:31:35	Yasmin Etienne Albuquerque	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termodecompromisso.pdf	14/12/2015 19:35:34	Yasmin Etienne Albuquerque	Aceito
Outros	autorizacalaboratorio.pdf	09/12/2015 17:50:55	Yasmin Etienne Albuquerque	Aceito
Outros	solicitacaobolsadesangue.pdf	04/12/2015 17:00:29	Yasmin Etienne Albuquerque	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	04/12/2015 16:27:50	Yasmin Etienne Albuquerque	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	04/12/2015 15:53:27	Yasmin Etienne Albuquerque	Aceito
Folha de Rosto	Folha.pdf	04/12/2015	Yasmin Etienne	Aceito

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

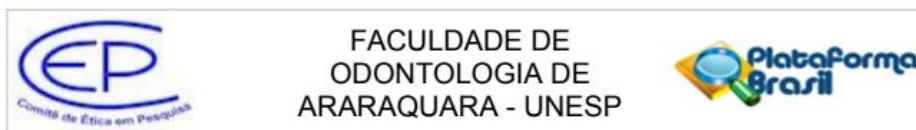
CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.476.491

Folha de Rosto	Folha.pdf	15:52:37	Albuquerque	Aceito
----------------	-----------	----------	-------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 04 de Abril de 2016

Assinado por:

Ligia Antunes Pereira Pinelli
(Coordenador)

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 22/11/2020

(prorrogado por mais dois anos, até 22/11/2022)

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 22 de novembro de 2018.

YASMIN ETIENNE ALBUQUERQUE