

ROSILENE BATISTA DE AGUIAR ALMEIDA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
***Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, *Tagetes minuta* L. e**
***Curcuma zedoaria* Roscoe FRENTE AOS**
MICRORGANISMOS *Candida* spp., *Staphylococcus* spp. e
Streptococcus mutans



2010

ROSILENE BATISTA DE AGUIAR ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
Cymbopogon citratus (D.C.) Stapf, *Tagetes minuta* L. e *Curcuma
zedoaria* Roscoe FRENTE AOS MICRORGANISMOS *Candida* spp.,
Staphylococcus spp. e *Streptococcus mutans***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção
do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em
BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.

Orientador: Prof. Titular Antonio Olavo Cardoso Jorge

São José dos Campos

2010

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2008

- A64a Almeida, Rosilene Batista de Aguiar.
Avaliação da atividade dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (D.C.)
Stapf, *Tagetes minuta* L. e *Curcuma zedoaria* Roscoe frente aos
microrganismos *Candida* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus mutans* /
Rosilene Batista de Aguiar Almeida. __ São José dos Campos : [s.n.], 2011
138 f. : il.
- Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São
Jose dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2011.
Orientador: Prof. Dr. Antonio Olavo Cardoso Jorge.
1. Biofilme. 2. Teste de sensibilidade microbiana. 3. Óleos essenciais. 4. *Candida*
spp. 5. *Staphylococcus* spp. 6. *Streptococcus mutans*. I. Jorge, Antonio Olavo
Cardoso. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José
dos Campos. III. Título

tD17

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 05 de Janeiro de 2011.

Assinatura:

E-mail: rosileneaguiar@gmail.com

BANCA EXAMINADORA

Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge (Orientador)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof. Dr. Geraldo Batista de Melo

Universidade Federal de Uberlândia - UFU

Profa. Dra. Silvana Soléo Ferreira dos Santos

Universidade de Taubaté

Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

São José dos Campos, 06 dezembro de 2010.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Arquimino e Alaide, por serem a minha base, pelo exemplo de vida, pelo amor, incentivo, sempre dispostos a se sacrificar pelos filhos.

Ao meu marido pelo amor, motivação e pelo apoio me ajudando a concretizar esta conquista.

A minha amada filha Evelyn que sempre está comigo, nas horas boas e difíceis sendo compreensiva e companheira.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge, uma pessoa sabia, não só parte na acadêmica como também na vida e que nos ensina por meios de suas atitudes a lidar com as diferentes situações no nosso cotidiano acadêmico, pela amizade e confiança. Toda a minha gratidão e admiração.

À Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira por toda atenção a mim destinada, desde o meu primeiro dia no laboratório, sempre apoiando, orientando, pela amizade.

AGRADECIMENTOS

À Deus todo poderoso, que dá forças para conquistar dia após dia.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Adj. José Roberto Rodrigues e do vice-diretor Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do Auxílio à Pesquisa que possibilitou a aquisição dos materiais necessários para a realização deste trabalho. Projeto número 2009/520481.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudo concedida.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

À Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito sempre disposta a ajudar, apesar das inúmeras tarefas, pela sua atenção e amizade.

À Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha pela amizade e incentivo, a primeira pessoa que me recebeu no Departamento de Biopatologia Bucal.

À Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira, pela amizade, um sorriso amigo que sempre a acompanha.

Ao Prof. Dr. Gokithi Akisue e Prof. Lincoln Marcelo Lourenço Cardoso pela disponibilidade e colaboração no fornecimento das plantas utilizadas neste trabalho.

Às secretárias da Seção de Pós-Graduação Rosemary de Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa, Lillian Faris das Graças e Maria Aparecida Consíglia de Souza pela presteza e disponibilidade no decorrer do curso.

Ao Carlos Guedes, por toda ajuda referente ao processo FAPESP.

Aos funcionários Sérgio Giovanny Alves, Maria de Fátima Pires, Ana Paula e Domingos Gonçalves Pontes pelo coleguismo e auxílios prestados durante o desenvolvimento do trabalho laboratorial.

Aos colegas e amigos da pós-graduação, aos que já saíram e aos atuais, sempre dispostos a ajudar uns aos outros.

A minha amiga ex aluna do curso Claunencil de Fátima Carreto que sempre me ajudou nos meus primeiros meses no laboratório, a Marta Majewski, ao Jonatas Rafael de Oliveira e a Simone Furgeri Godinho Vilela pela amizade e companheirismo, pelos bons e não tão bons momentos que passamos juntos.

Aos meus pais, Arquimino Preto de Aguiar e Alaide Batista de Aguiar, pela dedicação, sempre com muito amor, todos os dias da minha vida.

Ao meu marido, Odenir de Almeida, pelo amor e incentivo.

A minha filha Evelyn Natalie, por me fazer feliz todos os dias, através de seus atos, “lembrancinhas de papel”...

Aos meus irmãos Andreza e Alexandre que mesmo longe estavam presentes.

À família do meu marido Maria Aparecida da Silva e Oswaldo de Almeida *in memoriam* que sempre torceram por mim.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para tornar possível a realização deste trabalho.

*Se as águas do mar da vida quiserem te afogar, segura na
mão de Deus e vai. Não temas segue adiante e não olhes
para trás segura na mão de Deus e vai...*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
RESUMO	12
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Microrganismos	18
2.2. Leveduras do gênero <i>Candida</i>	19
2.3 <i>Staphylococcus</i> spp.	21
2.4 <i>Streptococcus mutans</i>	24
2.5 Biofilme	25
2.6 Plantas medicinais	26
3 PROPOSIÇÃO	32
4 MATERIAL E MÉTODO	33
4.1 Óleos essenciais	33
4.2 Microrganismos utilizados e preparo das suspensões	34
4.3 Determinação da concentração inibitória mínima e microbida (CIM e CMM)	35
4.4 Avaliação dos efeitos dos óleos essenciais sobre o biofilme formado em resina acrílica por <i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. mutans</i>	37
4.5 Grupos e condições experimentais	38
4.6 Sensibilidade dos microrganismos frente aos óleos essenciais em biofilme	39
4.7 Visualização em Microscopia Eletrônica de Varredura	42
5. RESULTADOS	45
5.1 Concentração inibitória mínima e microbida (CIM e CMM) do óleo essencial de <i>Cympopogon citratus</i> (D.C.) Stapf	46

5.2 Efeitos do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (D.C.) Stapf sobre biofilme	48
5.3 Visualização em MEV dos efeitos do óleo essencial de <i>C. citratus</i> no biofilme	50
5.4 Concentração inibitória mínima e microbicida (CIM e CMM) do óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> L.	59
5.5 Efeitos do óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> L sobre biofilme	60
5.6 Visualização em MEV dos efeitos do óleo essencial de <i>T. minuta</i> no biofilme	62
5.7 Concentração microbicida mínima e microbicida (CIM e CMM) do óleo essencial de <i>Curcuma zedoaria</i> Roscoe	73
5.8 Efeitos do óleo essencial de <i>Curcuma zedoaria</i> Roscoe sobre biofilme	75
5.9 Visualização em MEV dos efeitos do óleo essencial de <i>C. zedoaria</i> no biofilme	77
6 DISCUSSÃO	85
7 CONCLUSÃO	98
8 REFERÊNCIAS	100
9 APÊNDICE	114
ANEXO	135
ABSTRACT	136

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	= <i>American Type Culture Collection</i>
BHI	= <i>Brain heart infusion</i> (infusão cérebro coração)
C	= Controle
CIM	= Concentração inibitória mínima
CMM	= Concentração microbicida mínima
CO ₂	= gás carbônico
°C	= grau Celsius
D.C.	= Augustin-Pyramus De Candolle (1778-1841, suíço)
DO	= Densidade óptica
g	= grama
kGy	= KiloGray
L	= litro
L.	= Carolus Linnaeus (1707-1778, sueco)
h	= hora
Log	= logaritmo
mg	= miligrama
mL	= mililitro
MEV	= microscopia eletrônica de varredura
mg/mL	= miligrama por mililitro
min	= minuto
MSBS	= <i>Mitis salivarius</i> bacitracina sacarose
NaCl	= cloreto de sódio
nm	= nanômetro
PBS	= Solução fisiológica tampão fosfato
UFC/mL	= Unidades formadoras de colônias por mililitro
µL	= microlitro
%	= por cento
spp.	= espécies

Almeida RBA. Avaliação da atividade dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, *Tagetes minuta* L. e *Curcuma zedoaria* Roscoe frente aos microrganismos *Candida* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus mutans* [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Univ Estadual Paulista; 2010.

RESUMO

Na procura de meios preventivos e curativos para doença periodontal e cárie dentária, plantas medicinais com finalidade fungicida, bactericida e antiinflamatória vêm sendo investigadas. O objetivo desse trabalho foi o de avaliar a atividade antimicrobiana utilizando-se óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, *Curcuma zedoaria* Roscoe e *Tagetes minuta* L. sobre cepas de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* e *Candida* spp. em crescimento planctônico e em biofilme. Para estudo dos microrganismos em crescimento planctônico, foram determinadas a Concentração Inibitória Mínima e a Concentração Fungicida Mínima de nove cepas clínicas e uma cepa padrão para cada espécie: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. mutans*. Para avaliação dos efeitos dos óleos essenciais em biofilme, foram utilizadas cepas padrão de *Candida albicans* (ATCC 18804), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Streptococcus mutans* (ATCC 35688) isolados e em associações em corpos-de-prova durante cinco dias. A seguir, os corpos-de-prova em resina acrílica foram lavados e colocados em contato com óleos essenciais durante 5 min. O número de unidades formadoras de colônias obtidas em cada biofilme (UFC/mL) foram submetidos à análise estatística descritiva e teste *t*-Student utilizando-se o software Minitab considerando-se o nível de significância $p \leq 0,05$. Também foi realizada microscopia eletrônica de varredura (MEV) nos corpos-de-prova em resina acrílica com biofilme com tratamento e controle. Foram observadas reduções significativas do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) tanto no biofilme como em associação. As maiores reduções ocorreram no tratamento do óleo essencial de *C. citratus*, seguidas pelo óleo de *T. minuta* e *C. zedoaria*. Os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Tagetes minuta* e *Curcuma zedoaria* apresentaram atividade bacteriostática, fungistática e microbicida sobre todas as cepas de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* e *Candida* spp. na forma planctônica. As cepas mais sensíveis em relação a concentração microbicida mínima do óleo essencial de *C. citratus* foram *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* seguidas pelas cepas de *S. epidermidis*, *S. aureus* e *S. mutans*. As cepas mais sensíveis em relação concentração

microbicida mínima do óleo essencial de *T. minuta* foram às *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*; seguidas então pelas cepas bacterianas *S. aureus* e *S. epidermidis* e *S. mutans*. As cepas mais sensíveis em relação concentração microbicida mínima do óleo essencial de óleo de *C. zedoaria* foi *C. albicans* e a mais resistente foi *S. mutans*. Foi observada atividade microbiostática dos óleos essenciais sobre os biofilmes simples e mistos, com reduções significativas das UFC/mL.

Palavras-chave: Biofilme. Teste de sensibilidade microbiana. Óleos essenciais. *Candida* spp. *Staphylococcus* spp. *Streptococcus mutans*.

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais representam um importante recurso terapêutico desde a antiguidade até nossos dias. O uso de plantas medicinais é um aspecto característico da humanidade, sendo conhecido desde a antiguidade (Queralt et al., 2005, Gurib-Fakim, 2006; Gregio et al., 2006). Atualmente as pesquisas com o propósito de obter novos medicamentos a partir de plantas ou de aprimorar os fitoterápicos já existentes, representam importante papel na prevenção e no tratamento de algumas doenças (Queralt et al., 2005; Xavier et al., 2007; Sousa et al., 2008).

Torna-se difícil selecionar as espécies vegetais que devem ser investigadas quanto ao seu potencial farmacológico, levando-se em conta a imensa quantidade de espécies a serem exploradas. Por isso, os relatos da medicina popular costumam ser utilizados na identificação de espécies vegetais potencialmente terapêuticas, auxiliando nas pesquisas com plantas medicinais (Albuquerque et al., 2007).

Outro fator a ser considerado reporta à acessibilidade e aos custos dos medicamentos fitoterápicos. Pesquisas com plantas medicinais geralmente originam medicamentos em um curto prazo de tempo, com custos muitas vezes inferiores, para que possam ser utilizados como parte do atendimento às necessidades primárias de saúde da população que, em geral, encontra-se sem condições financeiras de arcar com os preços elevados dos medicamentos convencionais (Devienne et al., 2004; Lima Jr; Dimenstein, 2006).

A validação da utilização de plantas medicinais depende da investigação sistemática realizada com metodologia química, farmacológica e microbiológica, que somados a outros fatores irão resultar

no medicamento fitoterápico (Rojas et al., 1992; Mosihuzzaman; Choudhary, 2008;).

Os óleos essenciais constituem-se de elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais, e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos (Siqui et al., 2000; Vukovic et al., 2007).

A espécie *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, conhecida como capim-limão ou erva cidreira, é produtora de óleo essencial de alto valor comercial. O principal componente do óleo essencial dessa planta é o citral, uma mistura dos isômeros neral (cis-citral) e geranial (trans-citral) (Liberalli et al., 1946; Lewinsohn et al., 1998; Barbosa et al., 2008). Tais componentes apresentam propriedades antifúngica (Schuck et al., 2001), antibacteriana (Cimanga et al., 2002), diurética (Gálvez, et al., 1998) e anticarcinogênica (Puatanachokchai et al., 2002).

Outra espécie, *Tagetes minuta* L., popularmente conhecida como vara-de-rojão, rabo-de-foguete, cravo-de-defunto, cravo-de-urubu ou chinchilho, também tem sido estudada por apresentar atividade antimicrobiana (Lorenzi; Matos, 2002).

Outra planta de interesse, que também apresenta propriedades terapêuticas é a *Curcuma zedoaria* Roscoe conhecida como curcuma ou zedoaria. Estudos indicaram que seus rizomas possuem substâncias medicinais como pineno, canfeno, cineol, cânfora e borneol (Pereira, et al., 2004). Dentre suas propriedades terapêuticas na prática popular destacam-se a expectorante, diurética, calmante, colerética, depurativa, anti-séptica, antifúngica, anti-helmíntica, antitumoral, aromática e anti-inflamatória (Teske; Trenitini, 1994; Kato; Fischer, 1996; Schulz et al., 2002).

Na procura de meios preventivos para doença periodontal e cárie, estudos com plantas medicinais com propriedades fungicidas, bactericidas e antiinflamatórias são relatados na literatura. A cavidade

bucal abriga uma grande quantidade e variedade de microrganismos em uma microbiota estabelecida. Os fatores que influenciam esse complexo ecossistema são a higiene bucal, integridade dos dentes e mucosa, a natureza e a velocidade do fluxo salivar, a composição e a consistência da dieta, uso de antibióticos, o estado fisiológico e a saúde do hospedeiro (Aas et al., 2005; Huyghe et al., 2008).

A remoção do biofilme dentário é um fator importante na prevenção da cárie e doença periodontal (Marsh, 2005). Alguns produtos de origem vegetal são utilizados na higiene bucal com a vantagem de não apresentarem efeitos colaterais, quando comparados a produtos sintéticos (Moran et al., 1992). Assim, com a comprovação científica de que determinadas plantas poderiam ser utilizadas no tratamento de doenças bucais, a odontologia e a população poderão se beneficiar ao utilizar a fitoterapia.

A odontologia durante muito tempo considerou a cárie como uma doença a ser tratada apenas com preparos dos dentes e restaurações das cavidades. Estas condutas cuidavam apenas dos sintomas da doença, acreditando que as técnicas operatórias e os materiais restauradores seriam capazes de tratá-la. Esta filosofia levou muitas vezes à mutilação progressiva das estruturas dentárias (Murdoch-Kinch; Mclean, 2003; Fontana et al., 2010;). Atualmente, a Odontologia moderna tem como objetivos principais prevenir novas lesões, paralisar as já existentes e evitar lesões recorrentes, além da promoção de saúde bucal e conservação da estrutura dentária (Murdoch-kinch; Mclean, 2003). Almeja-se atualmente, o tratamento das causas da doença cárie e não somente de suas seqüelas (Fontana; González-Cabezas, 2000; Murdoch-Kinch; Mclean, 2003; Fontana et al., 2010).

Estudos demonstraram a capacidade de diferentes microrganismos em se aderir às superfícies dentárias e próteses dentais. Entre esses microrganismos, estão incluídas bactérias e espécies de leveduras do gênero *Candida* (Maza et al., 2002). As proteínas salivares

principalmente as mucinas, que recobrem a mucosa bucal e as superfícies inertes das próteses dentárias podem atuar como receptores específicos de *Candida albicans* e de outros microrganismos (Baena-Monroy et al., 2005).

Os microrganismos do gênero *Candida* são geralmente comensais da cavidade bucal, mucosas, trato digestivo, genital e urinário de indivíduos sadios, mas dependendo do estado fisiológico do indivíduo e de fatores predisponentes, podem transformar-se na forma parasitária, produzindo candidose (Soll, 2002).

As bactérias estão se tornando resistentes a múltiplos antimicrobianos, representado um desafio no tratamento de infecções. Assim, faz-se necessário encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem utilizadas no combate desses microrganismos (Ahmad; Beg, 2001; Jorge, 2006; Mbosso et al., 2010).

Baena-Monroy et al., (2005), verificaram que *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans* colonizam com frequência a mucosa bucal de pacientes com prótese dentária. A principal espécie bacteriana correlacionada com cárie dentária de superfície lisa é representada por *Streptococcus mutans* (Pin et al., 2005; Jorge, 2006).

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais das plantas *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, *Tagetes minuta* L. e *Curcuma zedoaria* Roscoe frente a cepas de *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Streptococcus mutans*. Foram também avaliados os efeitos dos mesmos óleos essenciais em biofilmes formados in vitro por cepas padrão de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* na superfície de discos de resina acrílica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microrganismos

Todo indivíduo possui uma microbiota indígena que inclui todas as classes de microrganismos (bactérias, fungos, protozoários e vírus) esta é composta por cerca de 500 a 1000 espécies diferentes, residindo no indivíduo. Tem sido estimado que o nosso corpo é composto de aproximadamente 10 trilhões de células (incluindo as células nervosas, musculares e epiteliais), e que temos aproximadamente 10 vezes mais microrganismos (100 trilhões) vivendo em nosso organismo (Burton; Engelkirk, 2004).

Os microrganismos presentes na microbiota bucal desempenham importante papel em manter a saúde bucal, entretanto o distúrbio desse sistema pode levar a ocorrência de doenças. Os microrganismos que compõem essa microbiota contribuem para o desenvolvimento do sistema imune do hospedeiro, seguidos de uma colonização balanceada de uma grande variedade de microrganismos que podem potencialmente invadir outros tecidos do hospedeiro (Barbieri et al., 2007).

2.2 Leveduras do gênero *Candida*

O gênero *Candida* compreende aproximadamente 150 espécies de leveduras, Gram-positivas, não produtoras de esporos. A espécie de maior importância médica é *Candida albicans* seguida por *C. glabrata* e *C. tropicalis* que perfazem cerca de 80% do isolamento de candidoses, são aeróbias, embora, sejam capazes de crescer em anaerobiose (Jorge, 2006).

Candida albicans é a levedura mais frequentemente isolada de amostras clínicas humanas (Komiyama et al., 2004; Burton; Engelkirk, 2004; Jorge, 2006), é considerada uma das leveduras mais patogênicas para o ser humano, colonizando língua, palato e demais mucosas bucais (Jorge, 2006; Jain et al., 2010) podendo estar presentes, também, no biofilme subgengival (Slots et al., 1988). Esse microrganismo é correlacionado com grande número de infecções oportunistas que em indivíduos imunocomprometidos, podem ser fatais (Baillie; Douglas, 1998; Lengeler et al., 2000; Jain et al., 2010).

Candida spp. é um organismo comensal presente no ser humano na pele e membranas mucosas da boca, trato gastrointestinal e geniturinário sem causar infecções, coexistindo com o hospedeiro (Hube; Naglik, 2001). O estado fisiológico do hospedeiro é o fator primário na etiologia da candidose, quando há uma queda das condições imunológicas do hospedeiro, *Candida albicans* é líder em infecções da boca, pele e vagina. Este tipo de infecção local pode tornar-se uma porta de entrada para invasão de microrganismos na corrente sanguínea, podendo tornar-se uma infecção generalizada ou sistêmica (Hube; Naglik, 2001; Burton; Engelkirk, 2004). Além disso, em pacientes severamente imunocomprometidos, a levedura pode causar sérias infecções nas mucosas, que incluem candidoses vaginais, infecções bucais ou

sistêmicas (Ellepola; Samaranayake, 1998; O'Sullivan et al., 2000; Chandra et al., 2001; Hube; Naglik, 2001).

Um aumento do número de indivíduos imunocomprometidos, tal como aqueles com infecção pelo HIV, neutropenicos, pacientes em tratamento intensivo, uso de medicamentos imunossupressivos depois de transplante de órgãos são causas freqüentes de infecção na mucosa por *Candida* (Richardson, 2005). Em adição quase 3/4 de todas as mulheres saudáveis já tiveram pelo menos uma vez infecção vaginal por leveduras (Hube; Naglik, 2001).

Os fatores de virulência expressos por *Candida albicans* para causar infecção podem variar muito, dependendo do tipo da infecção, o local e a natureza da resposta do hospedeiro (Hube; Naglik, 2001). *Candida albicans* é um microrganismo com grande repertório de atributos de virulência para colonizar o hospedeiro, causando danos, resistindo ou enganando o sistema de defesa do hospedeiro (Chaffin et al., 1998). Embora o objetivo principal do microrganismo não seja causar doença ou danos no hospedeiro, e sim, sobreviver e reproduzir (Burton; Engelkirk, 2004).

Candida glabrata é a segunda espécie do gênero mais recuperada da cavidade bucal de humanos, representa cerca de 7% das espécies isoladas da boca. Essa espécie é isolada freqüentemente de pacientes portadores de próteses total, incluindo aqueles com estomatite (Jorge, 2006).

Candida tropicalis pode ser encontrada em candidoses invasivas e hospitalares, com infecções indistinguíveis das produzidas por *Candida albicans*. Ela é encontrada no ambiente e culturas de rotina do nariz, garganta, pele, vagina e trato gastrintestinal de indivíduos saudáveis (Jorge, 2006).

A candidose bucal também já foi muito estudada em pacientes que fazem uso de próteses totais ou parciais. As leveduras aderem-se e colonizam as superfícies bucais, incluindo mucosas e

próteses acrílicas e tem habilidade de co-agregar com bactérias bucais (Barbeau et al., 2003; Cross et al., 2004; Ramage et al., 2004).

2.3 *Staphylococcus* spp.

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Staphylococaceae. São relatadas 48 espécies do gênero *Staphylococcus*, sendo ubíquo na natureza (Tse et al., 2010), dessas, 16 são encontradas em seres humanos e podem provocar diferentes síndromes clínicas, incluindo infecções cutâneas, oportunistas, das vias urinárias e sistêmicas (Blatt; Piazza, 2004; Trülsch et al., 2007; Xavier et al., 2007). O tratamento de infecções pós-operatórias é dificultado pelo aparecimento dos microrganismos resistentes aos antibióticos, os quais contribuem significativamente para morbidez e mortalidade de pacientes hospitalizados (O’Gara; Humphreys, 2001; Jabra-Rizk et al., 2006).

O gênero *Staphylococcus* não é usualmente pertencente à cavidade bucal humana, e quando isso acontece, eles são considerados transitórios (Loberto et al., 2004). O gênero apresenta importantes propriedades de virulência e causa uma larga gama de doenças infecciosas humanas incluindo pneumonia, septicemia, endocardites, doença periodontal entre outros (Wertheim et al., 2005; Baba et al., 2008).

A espécie mais implicada em doenças no ser humano é *S. aureus*. *S. epidermidis* também é um importante patógeno, sobretudo para aqueles portadores de próteses valvulares cardíacas (Huebner; Goldmann, 1999; Jorge, 2007).

As espécies do gênero *Staphylococcus* consistem em cocos Gram-positivos, tipicamente arranjados em grupos, lembrando “cachos de uva”, ou ainda isolados e em pequenas cadeias, não

esporulam, são imóveis, anaeróbios facultativos e produtores de catalase em sua maioria (Jorge, 2006).

Em geral, os *Staphylococcus* apresentam uma relação benigna ou simbiótica com o hospedeiro; entretanto podem tornar-se patogênicos quando ganham acesso aos tecidos por meio de traumatismos da barreira cutânea, inoculação por agulhas, ou implantação direta por próteses médicas (Pallin et al., 2008).

S. aureus é um dos mais significantes agentes etiológicos de processos infecciosos adquiridos, tanto em pacientes ambulatoriais como em pacientes hospitalizados (Pallin et al., 2008). Apresenta ampla variedade de fatores de virulência, como toxinas, adesinas, cápsula, formação de biofilme e enzimas extracelulares que mediam a invasão tecidual e a sobrevivência no sítio da infecção (Götz, 2004; Blatt; Piazza, 2004; Gordon; Lowy, 2008). Algumas espécies são produtoras de coagulase, característica que classifica os estafilococos em coagulase-positivos e negativos (Jorge, 2006).

Cepas de *S. aureus* resistentes aos medicamentos foram sendo isoladas à medida que novos antimicrobianos foram desenvolvidos e introduzidas no tratamento das infecções. A habilidade de adquirir resistência levou ao aparecimento de amostras resistentes a praticamente todos os agentes antimicrobianos disponíveis (Spellberg et al., 2008). Estas cepas podem ser isoladas em materiais e equipamentos usados em ambiente hospitalar e constituem um dos problemas mais relevantes no controle de infecções e na terapêutica antimicrobiana (Rossi; Andreazzi, 2005; Jorge, 2007).

Loberto et al. (2004) avaliaram 88 pacientes com periodontitis crônica, antes de receberem tratamento periodontal ou antibiótico. Os resultados demonstraram que em 14 dos indivíduos (15,9%) foram isolados *S. epidermidis* em amostras subgengival e de 24 indivíduos (27,27%) na cavidade bucal, enquanto que *S. aureus* estavam presentes em (25%) de amostras da cavidade bucal.

Querido (2006), quando estudou microrganismos da cavidade bucal de indivíduos submetidos à antibióticoterapia para tratamento de tuberculose pulmonar verificou que, dos 50 indivíduos amostrados, 96% dos pacientes com tuberculose e 92% do grupo controle apresentaram *Staphylococcus* spp. na cavidade bucal. No sulco gengival *Staphylococcus* spp. estavam presente em 44% dos indivíduos do grupo controle e 38% no grupo tuberculose.

S. epidermidis são coagulase negativos e encontram-se largamente distribuídos pelo organismo humano, constituindo a maioria das bactérias comensais da microbiota. No passado esses microrganismos eram considerados como não-patogênicos e seus isolamentos em laboratório eram considerados como contaminação da espécie. Entretanto, esses organismos frequentemente contaminam o sangue e outros materiais clínicos e são responsáveis por infecções hospitalares, veiculados por cateteres e sondas. A espécie não produz toxinas e faz parte da microbiota endógena humana, sendo que as infecções causadas por esta espécie são geralmente de origem hospitalar, sendo apontado como importante agente de bacteremia, em serviços de oncologia e neonatologia. É também reconhecida a sua crescente frequência em infecções associadas à implantação de próteses cardíacas, articulares e vasculares e de cateteres intravenosos (O’Gara; Humphreys, 2001).

2.4 *Streptococcus mutans*

Os estreptococos do grupo mutans incluem as principais espécies bacterianas envolvidas na cárie dentária de superfície lisa. Apresentam-se como cocos Gram-positivos, usualmente dispostos em cadeias, são anaeróbios facultativos ou estritos, seu crescimento é estimulado pela presença de CO₂ (Pin et al., 2005; Canetierri et al., 2006). Apresentam células esféricas ou ovais, por vezes alongadas, de cerca de 0,5 a 0,75 µm, são imóveis, capsulados e não formam esporos. São constituído por sete espécies e por oito sorotipos. As espécies deste grupo mais comumente relacionadas com o desenvolvimento da cárie dental em humanos são *S. mutans* e *S. sobrinus* (Balakrishnamet et al., 2002; Jorge, 2006).

Durante seu processo evolutivo, *S. mutans* desenvolveu fatores que determinam sua cariogenicidade ou virulência, como o sistema enzimático para o metabolismo da sacarose, substância mais cariogênica consumida pelos seres humanos (Kuramitsu et al., 2007). *S. mutans* é considerado um microrganismo cariogênico para todas as espécies de animais dentados até hoje testadas. Observa-se, entretanto, que cáries obtidas com a participação de *S. mutans* e da microbiota normal da boca são mais extensas e freqüentes do que só com *S. mutans*, demonstrando assim, a participação efetiva da microbiota bucal na etiologia da doença (Napimoga et al., 2005; Forssten et al., 2010).

Para colonizar a cavidade bucal, *S. mutans* adere nas superfícies duras, não descamativas, as quais coloniza e se acumula como parte da complexa microbiota do biofilme dentário (Kuramitsu et al., 2007; Jorge, 2007).

A cárie é uma doença infecciosa e transmissível, de origem microbiana, causando um processo de desmineralização por meio da produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido lático, originado da fermentação dos carboidratos da dieta do hospedeiro, pelas bactérias. Devido à sua natureza multifatorial e origem microbiana, pode variar de intensidade e prevalência de acordo com as condições endógenas de cada hospedeiro como dentes, película adquirida, saliva, dieta e microbiota (Balakrishnan et al., 2000; Barbieri et al., 2007).

2.5 Biofilme

O biofilme consiste em comunidades de células bacterianas ou outros microrganismos envolvidos por uma matriz polissacarídica extracelular que é secretada pelos próprios microrganismos, que permanecem aderentes a superfícies inertes ou vivas (Götz, 2002; Lamfon et al., 2003;). Os microrganismos crescem em pequenos grupos (microcolonias) que são separados por um sistema de canais de água. O fluido que circula entre esses canais, banha as microcolonias com nutrientes dissolvidos e levando os produtos residuais. Os biofilmes tem importância médica podendo ser encontrados em praticamente todo lugar, eles vem sendo envolvidos em doenças tal como endocardites, fibrose cística, doença periodontal, infecções renais, infecções do ouvido médio e infecções na próstata (O’Gara; Humphreys, 2001; Burton; Engelkirk, 2004).

A formação do biofilme possui etapas seqüenciais. Inicialmente os microrganismos se aderem à superfície dental, ocorre crescimento celular e formação de microcolônias e posteriormente maturação do biofilme. Cada passo pode ser influenciado por fatores

genéticos e fisiológicos desse modo formando uma massa celular, aderente, reforçada e arquitetural (Götz, 2002; Kreth et al., 2004).

Biofilmes são muito resistentes a antibióticos e desinfetantes. Antibióticos que, no laboratório tem se mostrado efetivo contra microrganismos na forma planctônica, torna-se ineficiente contra os mesmos microrganismos no biofilme (Burton; Engelkirk, 2004).

Vicente et al. (2008) avaliaram 237 crianças, na faixa etária de 5 a 11 anos durante 12 meses e observaram que 81% das crianças apresentaram alta contagem de *S. mutans* e apenas 19% apresentaram baixa contagem em agar *Mitis salivarius* bacitracina sacarose. Com relação ao índice de atividade de cárie, verificou-se que 73% apresentaram alta prevalência da doença. A concentração de *S. mutans* é freqüentemente alta na saliva de pacientes com elevados níveis de cárie dental.

O desenvolvimento da cárie ocorre na presença de microrganismos na superfície dentária, entretando a simples colonização por estes microrganismos não implica no seu desenvolvimento. Segundo Gilbert et al. (2007) o fator primário de uma boa saúde bucal é a rotina no controle do biofilme dentário.

Enquanto no passado, pesquisadores estudavam caminhos para controlar o crescimento de bactérias em cultivos planctônicos, os mesmos estão agora concentrando seus esforços para entender e controlar o biofilme (Burton; Engelkirk, 2004).

2.6 Plantas medicinais

A expressão fitoterapia é atribuída a medicamentos originados exclusivamente de material botânico integral ou seus extratos usados com o propósito de tratamento de doenças. As plantas medicinais

são aquelas que possuem atividade biológica, possuindo um ou mais princípios ativos úteis à saúde humana (Ferreira et al., 1998). As plantas produzem uma variedade de compostos com propriedades antimicrobianas (Duarte et al., 2005).

Atualmente, as pesquisas realizadas com plantas confirmam a ação medicinal de muitas plantas tradicionalmente usadas, o que traz aos pesquisadores a convicção de que há muito a aprender com os costumes populares (Devienne et al., 2004).

Plantas dos biomas brasileiros tem sido utilizadas como medicina natural pelas populações locais para o tratamento de várias doenças, como por exemplo, malária, infecção fúngica e bacteriana (Sartoratto et al., 2004). Apesar da rica flora brasileira, somente dados de poucas plantas estão disponíveis, incluindo espécies nativas e exóticas, que foram introduzidas no Brasil após a colonização e vem sendo incorporadas na medicina popular (Duarte et al., 2005)

Os óleos essenciais contidos nas plantas aromáticas são responsáveis pelos diferentes odores que emanam das plantas, constituem-se em complexas misturas de substâncias voláteis (Ye, 2009), sintetizadas graças a energia solar pelas células secretoras das plantas aromáticas e que se apresentam como substância líquida e oleosa.

A espécie *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (Figura 1), também conhecida como capim-limão ou erva cidreira, entre outros, pertence à família Gramineae originária da Ásia e subespontânea nos países tropicais. Desenvolve-se em todo o Brasil e caracteriza-se por ser uma erva perene, com folhas ásperas, aromáticas, estreitas e com mais de 50 cm de comprimento (Cimanga et al., 2002). É uma planta de grande resistência e versatilidade, suportando larga variedade de solo e de clima, embora não se adaptem bem em solo úmidos e enxarcados, assim como zonas frias, sujeitas a geadas (Liberalli et al., 1946)

É uma planta com largo uso popular na preparação de chás e seu óleo essencial, rico em citral (geranial e neral), é usado na

indústria de perfumes, alimentos e medicamentos (Kochima et al., 2006), possuindo alto valor comercial.

Schuck et al. (2001) avaliaram a atividade antimicrobiana de *C. citratus* por meio da técnica de difusão em agar de cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e os resultados revelaram que o óleo essencial a 0,5% apresentou diâmetro de inibição variando de 12 a 16 mm para *E. coli* e superior a 40 mm para *S. aureus* na diluição 1,5%.



Figura 1 – *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf
Fonte: www.google.com.br/images - pesquisar *Cymbopogon citratus*

O gênero *Tagetes* engloba algumas espécies da família das Compositae ou Asteraceae, é nativa de regiões temperadas e montanhosas do sudeste da América do Sul, podendo ser encontradas nos países como Argentina, Bolívia, Peru e Paraguai. *T. minuta* é encontrada no Brasil onde se aclimataram perfeitamente, tornando-se até subespontâneas (Lorenzi; Matos, 2002).

Segundo Kissmann; Groth (1992), *Tagetes minuta* L. (Figura 2), a espécie *minuta* faz referência ao tamanho das flores e não da planta, que pode alcançar até 2 metros de altura. Segundo Soule (1993) a planta é popularmente denominada vara-de-rojão, rabo-de-foguete, cravo-de-defunto, cravo-de-urubu, chinchilho, coari, coari-bravo,

estrondo, sendo considerada como planta daninha infestante, de cultivos anuais e perenes, bem como na beira de estradas e terrenos baldios.

Héthelyi et al. (1987) utilizaram a técnica de arraste a vapor para a extração do óleo essencial de *T. minuta* e através de métodos cromatográficos, separaram e dosaram alguns componentes que foram identificados por espectrometria de massa (ocimeno, diidroxitagetona, tagetona e ocimenona).

Souza et al. (2000) utilizaram decocto de *Tagetes minuta* em testes para determinar a atividade antimicrobiana através da técnica de diluição seriada, utilizando inóculos de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecium*) e Gram-negativas (*Salmonella gallinarum* e *Escherichia coli*) e verificaram o atributo anti-séptico, conferido popularmente ao decocto.



Figura 2 – *Tagetes minuta* L.

Fonte: www.google.com.br/images - pesquisar *Tagetes minuta*

A *Curcuma zedoaria* Roscoe (Figura 3), conhecida popularmente como gajitsu, curcuma ou zedoária, é uma espécie herbácea, perene, pertencente à família vegetal Zingiberaceae, de ocorrência espontânea na Ásia e utilizada desde a idade média como

condimento, corante, aromatizante e para fins terapêuticos. As partes vegetais empregadas com finalidades terapêuticas são as raízes e os rizomas, ricos em óleos essenciais, os quais podem ser empregados na forma de infuso, decocto, tintura, pó ou pedaços mastigáveis (Teske; Trenitini, 1994; Kato; Fischer, 1996). Os rizomas têm de 1,5 a 5% de óleo essencial, o qual é constituído principalmente por pineno, canfeno, cineol, cânfora e borneol (Pereira et al., 2004).

Entre as indicações terapêuticas da *C. zedoaria*, destacam-se as propriedades, expectorantes, diuréticas, calmantes, colerética, anti-séptica, antifúngica, anti-helmíntica, antimicrobiana, antitumoral, aromática e antiinflamatória (Teske; Trenitini, 1994; Kato; Fischer, 1996; Schulz et al., 2002). Nicoletti et al. (2003) estudaram a atividade antimicrobiana do extrato fluido da *C. zedoaria* frente aos microrganismos: *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus* e *Trichophyton mentagrophytes* e a ação do extrato foi mais efetivo, entretanto, contra *Staphylococcus aureus*.

Lai et al. (2004) avaliaram o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Curcuma zedoaria* em microrganismos Gram positivos (*Bacillus cereus*) e Gram negativos (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*). Os autores constataram que, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Vibrio parahaemolyticus* foram mais sensíveis, enquanto que a cepa de *Escherichia coli* apresentou maior resistência.



Figura 3 - *Curcuma zedoaria* Roscoe

Fonte: www.google.com.br/images - pesquisar *Curcuma zedoaria*

A partir do extrato hidroalcólico de *C. zedoaria* foram obtidas soluções aquosas a 7,1%, sendo empregadas como coadjuvante químico no controle mecânico do biofilme dentário e gengivite por apresentarem significativa ação anti-inflamatória e antimicrobiana (Sandrini et al., 1997; Pereira et al., 2004).

3 PROPOSIÇÃO

A presente pesquisa teve como objetivos:

- a) Determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações microbidas mínimas (CMM) dos óleos essenciais extraídos de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, *Tagetes minuta* L. e *Curcuma zedoaria* Roscoe sobre cepas clínicas e padrão de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus mutans*;
- b) Verificar os efeitos desses óleos essenciais sobre biofilmes formados na superfície da resina acrílica por cepas padrão de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Óleos essenciais

Foram utilizados óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, *Tagetes minuta* L. e *Curcuma zedoaria* Roscoe (Figura 1 a 3).

As espécies *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, *Tagetes minuta* L. e *Curcuma zedoaria* Roscoe foram coletadas no Sítio Pinheiros, na localidade de Sarapuí-do-Alto, Vila Élvio, município de Piedade, estado de São Paulo, Brasil. As plantas foram coletadas no período da manhã entre 9:00 e 10:00 h. As datas das coletas foram: 06/09/2007 para *C. citratus*, 20/06/2009 para *T. minuta* e 19/11/2009 para *C. zedoaria*.

As exsiccatas foram depositadas no Herbário SPF do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo, Rua do Matão, 277, edifício Sobre-as-Ondas, CEP 05508-090, São Paulo, SP, Brasil, sob os números G. Akisue 031 (SPF) para *C. citratus* e G. Akisue 033 (SPF) para *T. minuta*.

A extração dos óleos foi realizada no Laboratório de Farmacognosia e Plantas Medicinais da Faculdade de Pindamonhangaba (FAP), pela técnica de hidrodestilação por arraste de vapor d'água empregando-se aparelho do tipo Clevenger modificado (Wasicky; Akisue, 1969). Para a extração dos óleos essenciais foram utilizadas as folhas de *C. citratus*, as inflorescências de *T. minuta* e os rizomas de *C. zedoaria*.

4.2 Microrganismos utilizados e preparo das suspensões

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram utilizadas 54 cepas clínicas, sendo 9 de cada espécie e 1 cepa padrão a seguir: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*. Essas cepas são provenientes do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos / UNESP e foram isoladas da cavidade bucal humana no trabalho de Querido (2006). O projeto de pesquisa do presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos –Unesp, sob protocolo nº 01/ 2008-PH/CEP (Anexo A).

Para avaliação dos efeitos dos óleos essenciais no biofilme formado nos corpos-de-prova de resina acrílica foram estudadas as seguintes cepas padrão: *Candida albicans* (ATCC 18804), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Streptococcus mutans* (ATCC 35688). A partir das cepas clínicas e cepas padrão foram preparadas suspensões em solução de NaCl a 0,85% contendo 10^6 células quantificadas em espectrofotômetro (Micronal - B582, São Paulo, Brasil) (Figura 4) utilizando-se os parâmetros do Quadro 1. Solução de NaCl a 0,85% foi empregada como branco.

Quadro 1 – Microrganismos utilizados no preparo das suspensões com respectivos meios de cultura, condições de incubação, densidade óptica (DO) e comprimento de onda.

Microrganismos	Meios de cultura*	Incubação	DO	Comprimento de onda (nm)
<i>Candida</i> spp.	Agar Sabouraud	37°C/24 h	0,284	530
<i>Staphylococcus</i> spp.	Brain Heart infusion	37°C/24 h	0,374	490
<i>S. mutans</i>	Brain Heart infusion	37°C/24 h com 5% de CO ₂	0,620	398

* Difco, Detroit, USA

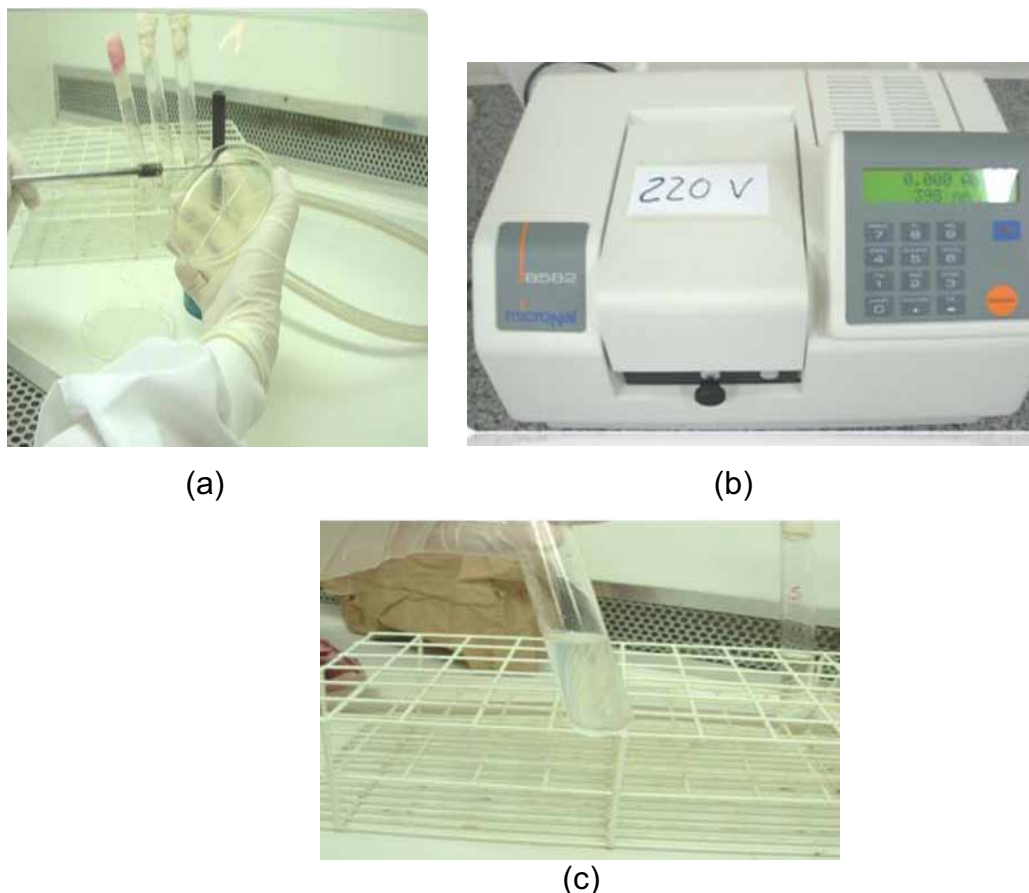


Figura 4 – Padronização da suspensão microbiana: (a) coleta do microrganismo do agar com auxílio de alça de platina; (b) aparelho de espectrofotômetro utilizado para padronização da suspensão de microrganismo; (c) suspensão microbiana padronizada, contendo 10^6 células/mL.

4.3 Determinação da concentração inibitória e microbicida mínima (CIM e CMM)

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais de *C. citratus*, *T. minuta* e *C. zedoaria* foi utilizado o método de microdiluição em caldo. Os óleos essenciais foram colocados em tubos de ensaios esterilizados juntamente com água destilada estéril e Tween 80, de acordo, com o volume e concentração desejada (Lima et al., 2006). A solução foi agitada por 5 minutos utilizando-se aparelho Vortex (Fanem), obtendo-se então uma solução

com a concentração final desejada para cada óleo essencial para cada espécie.

Em placas de 96 poços (Costar Corning, New York, EUA), foram acrescentados previamente 125 µL do caldo Sabouraud ou BHI em todos os poços, a seguir, nas primeiras colunas dos poços da placa de 96 poços foram colocadas 125 µL da solução do óleo essencial com a concentração previamente estabelecida para cada espécie. Diluições seriadas dos óleos essenciais foram realizadas na placa com auxílio de micropipeta automática de forma a representarem 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 e 1/128 da concentração inicial (Lima et al., 2006). A seguir, foram adicionados em todos os poços da placa 12,5 µL da suspensão padronizada (10^6 células/mL) de cada cepa de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* e *Candida* spp. Os ensaios foram realizados em duplicata. O grupo controle foi constituído de 125 µL de caldo Sabouraud e 125 µL de água destilada autoclavada com Tween 80 (Lima et al., 2006) nas mesmas diluições utilizadas na solução do óleo essencial e 12,5 µL da suspensão dos microrganismos. Após, incubação em estufa bacteriológica por 24 horas a 37°C para *Candida* spp. e *Staphylococcus* spp. e para *Streptococcus mutans* por 24 horas a 37°C em estufa de CO₂, a leitura foi realizada por observação visual da turvação do meio. Foi considerada concentração inibitória mínima (CIM) a menor concentração do óleo essencial testado, capaz de inibir o crescimento microbiano em caldo.

Na determinação da concentração microbida mínima (CMM) dos óleos essenciais de *C. citratus*, *T. minuta* e *C. zedoaria* três inóculos do teste anterior que não apresentaram crescimento em caldo foram semeados em placas contendo agar Sabouraud dextrose para determinação da concentração fungicida mínima para *Candida* spp. e agar BHI para a determinação bactericida mínima para *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus mutans*. Para isso, 100 µL do inóculo foram semeados em agar Sabouraud dextrose ou agar BHI (Quadro 1)

utilizando-se alça Drigalski (Figura 10b). Após período de incubação de 48 horas a 37°C e para *S. mutans* 48 horas a 37°C em estufa de CO₂, foi verificado crescimento de colônias características de cada espécie. Foi considerada concentração microbicida mínima como sendo a menor concentração dos óleos essenciais testados capazes de inibir totalmente o crescimento microbiano em meio de cultura sólido em placas de Petri.

4.4 Avaliação dos efeitos dos óleos essenciais sobre o biofilme formado em resina acrílica por *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans*

Foram utilizados como corpos-de-prova (Figura 5a e 5b), discos para confecção de prótese ocular com pino (Clássico, São Paulo, Brasil), em resina acrílica incolor, com 11 mm de diâmetro. Para os ensaios cada corpo-de-prova recebeu duas camadas de esmalte (Figura 5) para unhas (Colorama, São Paulo, Brasil) no pino e na base, a fim de que, ocorresse uma delimitação da área para formação do biofilme, o qual foi formado somente na parte superior do corpo-de-prova. Após a secagem do esmalte nos corpos-de-prova em resina acrílica, os mesmos foram embalados e encaminhados para esterilização por radiação gama (cobalto 60), com dosagem de 20 KGy por 6 h (Embrarad, São Paulo, Brasil).

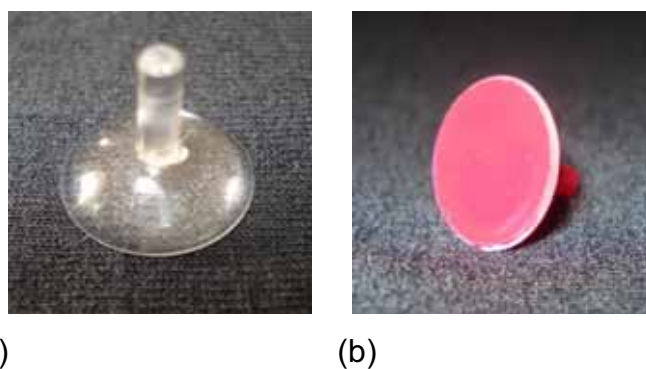


Figura 5 – Corpo-de-prova em resina acrílica incolor para confecção de prótese ocular com pino (Clássico, São Paulo, Brasil): (a) Corpo-de-prova com pino; (b) corpo-de-prova com a base pintado com esmalte para unhas; corpo-de-prova com o pino e a base pintados com esmalte para unhas.

4.5 Grupos e condições experimentais

Após esterilização os corpos-de-prova em resina acrílica foram divididos nos grupos experimentais, conforme Quadro 2:

Quadro 2 – Distribuição dos corpos-de-prova em resina acrílica nos grupos experimentais e controle

Grupos	Biofime	<i>C. citratus</i>	Controle	<i>C. zedoaria</i>	Controle	<i>T. minuta</i>	Controle
G1	<i>C. albicans</i>	12	12	12	12	12	12
G2	<i>S. aureus</i>	12	12	12	12	12	12
G3	<i>S. mutans</i>	12	12	12	12	12	12
G4	<i>C. albicans</i> e <i>S. aureus</i>	12	12	12	12	12	12
G5	<i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i>	12	12	12	12	12	12
G6	<i>S. aureus</i> e <i>S. mutans</i>	12	12	12	12	12	12
G7	<i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. mutans</i>	12	12	12	12	12	12
Total		84	84	84	84	84	84

Os corpos-de-prova em resina acrílica foram colocados na fileira A de placas de cultura de células com 24 poços (Costar Corning, New York. EUA), sendo adicionado posteriormente 2 mL do caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, Difco, Detroit, USA) sacarosado (5%). A seguir, foi inoculado 100 µl de suspensão contendo 10^6 células de cada microrganismo, conforme o grupo experimental (Quadro 2). As placas foram incubadas por 5 dias em estufa bacteriológica a 37°C para os grupos G1, G2 e G4 e para os grupos contendo *S. mutans* (G3, G5, G6 e G7) em estufa bacteriológica de CO₂ a 5%.

Após crescimento dos biofilmes (Figura 7), os corpos-de-prova em resina acrílica foram lavados duas vezes a fim de remover o material que não se aderiu. Para a lavagem foi colocado em cada poço da segunda e terceira fileira da placa, 2 mL de PBS (*Phosphate Buffer Saline*) pH 7, onde foram imersos os corpos-de-prova de resina acrílica e homogeneizados por 5 minutos para cada fileira (Figura 7) em agitador Orbital (Solab, Piracicaba, Brasil).

4.6 Sensibilidade dos microrganismos frente aos óleos essenciais em biofilmes

Para avaliar a sensibilidade dos microrganismos aos óleos essenciais, os corpos-de-prova em resina acrílica foram transferidos para um recipiente (50 mL) contendo 5 mL da solução diluída do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, *Tagetes minuta* e *Curcuma zedoaria* pré estabelecidos na CIM e CMM para cada microrganismo, permanecendo por 5 min (Figura 8). Para o controle, os corpos-de-prova em resina acrílica foram colocados em solução de água com Tween 80 pelo mesmo período de tempo. A seguir, os corpos-de-prova em resina acrílica foram mergulhados em placas de 24 poços contendo PBS pH 7

para retirar possíveis resíduos de óleo essencial (Figura 8b) e colocados em tubos de ensaio Falcon contendo 10 ml de solução PBS esterilizada os quais foram submetidos ao homogeneizador ultra-sônico (Sonoplus HD 2200 - Bandelin Eletronic), utilizando-se potência de 50 W durante 30 segundos, para dispersão dos microrganismos aderidos à superfície do corpo-de-prova (Figura 9). A partir da solução obtida, foram realizadas diluições (10^{-1} a 10^{-4} mL), das quais alíquotas de 100 μ L foram semeadas em duplicata em agar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (União Química, São Paulo, Brasil) (0,1 mg/mL de meio) para cepas de *C. albicans*; agar manitol (Difco, Detroit, USA) para *S. aureus* e agar mitis salivarius acrescido de bacitracina (0,2 UI/mL) (União Química, São Paulo, Brasil) e 15% de sacarose (Synth, Brasil) (MSBS) para *S. mutans*.

Após 48 horas de incubação o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foram determinadas para cada corpo-de-prova. As placas escolhidas para contagem foram aquelas que apresentaram entre 30 e 300 colônias de cada diluição. Os resultados da contagem de UFC/mL foram transformados em logarítimo de base 10 (Log_{10}) e submetidos à análise estatística descritiva e teste *t*-Student utilizando-se o software Minitab (Inc. PA, USA) considerando-se o nível de significância $p \leq 0,05$.



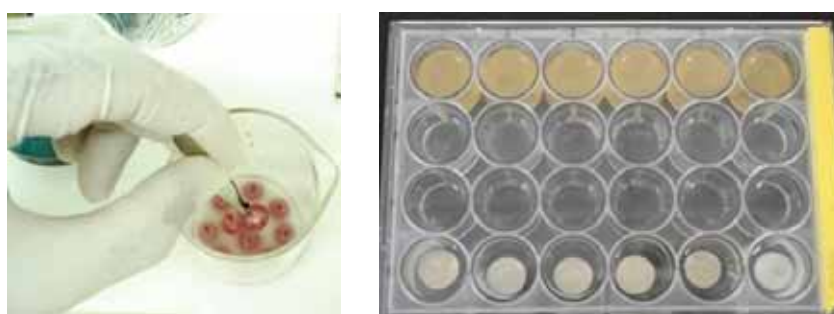
Figura 6 – Formação do biofilme em placa 24 poços. Primeira fileira com caldo BHI sacarosado, corpo-de-prova e suspensão microbiana.



(a)

(b)

Figura 7 – Procedimento para o tratamento do biofilme nos corpos-de-prova após 5 dias de incubação em estufa bacteriológica. (a) Primeiro enxágüe dos corpos-de-prova em resina acrílica em solução PBS; (b) agitador orbital utilizado para auxiliar a remoção das células microbianas não-aderidas.



(a)

(b)

Figura 8 – Avaliação da sensibilidade dos microrganismos frente os óleos essenciais. (a) corpos-de-prova em resina acrílica transferidos para um recipiente (50 mL) contendo 5 mL da solução diluída do óleo essencial; (b) corpos-de-prova em resina acrílica mergulhados na quarta fileira da placa de 24 poços contendo PBS para retirar resíduo do óleo essencial após o tratamento.

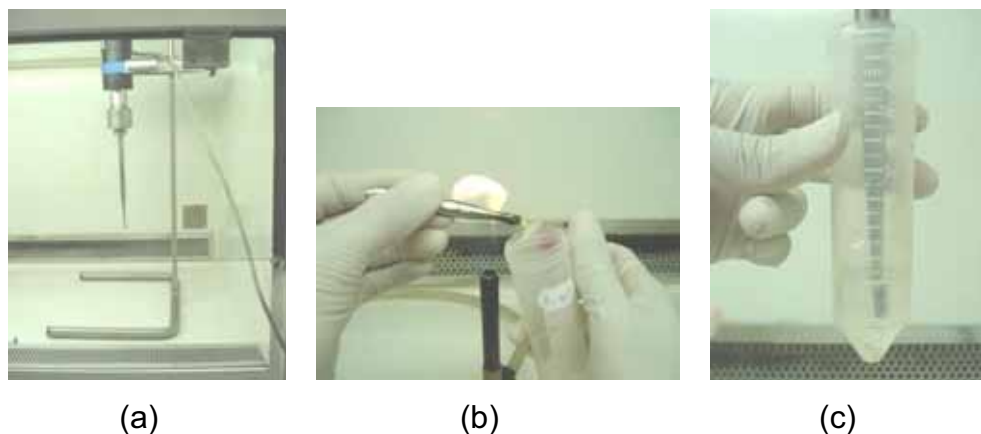


Figura 9 - Dispersão do biofilme para a quantificação dos microrganismos. (a) homogeneizador ultra-sônico; (b) inserção do corpo-de-prova na solução de PBS; (c) dispersão do biofilme do corpo-de-prova para solução de PBS com auxílio do homogeneizador ultrasônico.

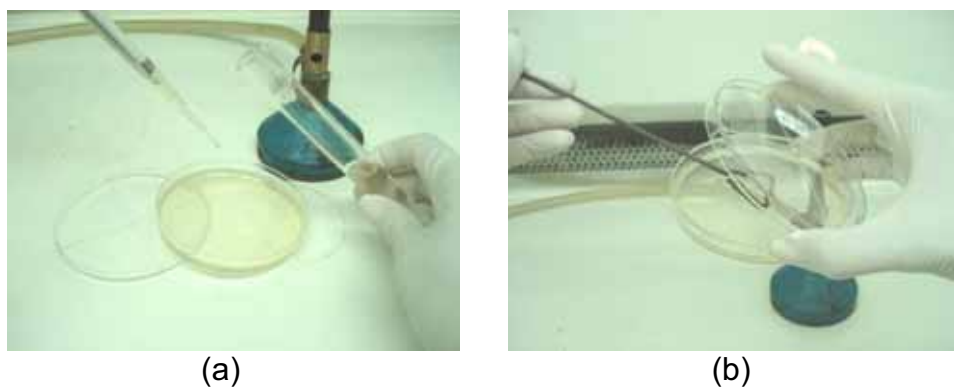


Figura 10 - Quantificação dos microrganismos. (a) inoculação da suspensão microbiana em placa de Petri com agar; (b) semeadura da suspensão microbiana em meio de cultura sólido com auxílio de alça Drigalski.

4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para visualizar os efeitos do óleo essencial nos biofilmes formados de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* e das demais associações de microrganismos, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV) (JSM-5310, JEOL, Japão) no Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) de São José dos Campos/SP.

Foram utilizados 2 corpos-de-prova (1 tratamento e 1 controle) em resina acrílica de cada grupo para ser submetido à análise em microscopia eletrônica de varredura (Quadro 3).

Quadro 3 - Distribuição dos corpos-de prova submetidos à microscopia eletrônica de varredura.

Grupos	Biofilme	<i>C. citratus</i>	Controle	<i>C. zedoaria</i>	Controle	<i>T. minuta</i>	Controle
G1	<i>C. albicans</i>	1	1	1	1	1	1
G2	<i>S. aureus</i>	1	1	1	1	1	1
G3	<i>S. mutans</i>	1	1	1	1	1	1
G4	<i>C. albicans</i> e <i>S. aureus</i>	1	1	1	1	1	1
G5	<i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i>	1	1	1	1	1	1
G6	<i>S. aureus</i> e <i>S. mutans</i>	1	1	1	1	1	1
G7	<i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. mutans</i>	1	1	1	1	1	1
Total		7	7	7	7	7	7

Os corpos-de-prova em resina acrílica foram removidos do caldo e foi realizada a fixação dos microrganismos aderidos na superfície dos corpos-de-prova em resina acrílica com glutaraldeído 2,5% por 1 hora. A seguir os biofilmes foram desidratados em solução alcoólica a 10%, 25%, 50%, 75% e 90% por vinte minutos em cada e finalmente por uma hora em álcool absoluto (Figura 11). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas para secagem do biofilme.

A seguir os corpos-de-prova em resina acrílica, foram fixados em *stubs* metálicos (Figura 12) e foi realizada a metalização das amostras por *sputtering* (Denton Vacuum Desk, Denton Vacuum, USA) com fio de ouro de 10^{-9} mm de espessura (Figura 12). Posteriormente, os biofilmes formados nos corpos-de-prova foram visualizados e

fotografados no microscópio eletrônico de varredura em 15 KV nos aumentos de 1000 e 5000 vezes.

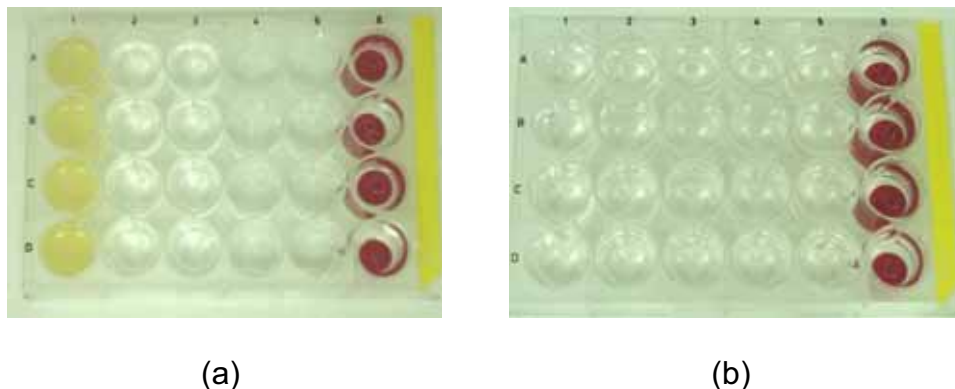


Figura 11 – Preparo dos corpos-de-prova em resina acrílica para metalização. (a) Placa de Petri de 24 poços (coluna 1 caldo BHI com biofilme; coluna 2 e 3 solução PBS para dispersão das células não aderidas; coluna 4 lavagem após tratamento com o óleo essencial; coluna 6 imersão do corpo-de-prova em glutaraldeído (2%); (b) Colunas da placa (1 a 6) com as diferentes concentrações do álcool (10, 25, 50, 75, 90 e 100%).



Figura 12 – Processo de metalização dos corpos-de-prova em resina acrílica. (a) aparelho metalizador com corpos de prova fixados nos *stubs* metálicos antes da metalização; (b) *stubs* com os corpos-de-prova em resina acrílica metalizados.

5 RESULTADOS

Os óleos essenciais utilizados apresentaram redução de UFC/mL em relação ao grupo controle para todas as concentrações testadas, tanto para a forma planctônica quanto para o biofilme.

De acordo com os resultados, as diluições dos óleos essenciais variaram para cada óleo, sendo que o óleo de *C. citratus* foi o que apresentou menor concentração para o efeito inibitório ou microbicida tanto na forma planctônica como em biofilme. Para facilitar o entendimento, os resultados obtidos estão demonstrados nas Tabelas 1 a 6 de acordo com o óleo essencial utilizado, a concentração utilizada do óleo essencial e a porcentagem dos microrganismos inibidos (CIM) ou mortos (CMM) em cada concentração do óleo. A porcentagem dos microrganismos inibidos é apresentada nas colunas das Tabelas 1 a 6. Todas as cepas ATCC dos microrganismos apresentaram (CIM e CMM) dos óleos essenciais testados sempre numa diluição posterior ao das maiores das cepas clínicas de cada espécie utilizada (Tabelas 1 a 6).

Na análise dos resultados da CIM observou-se que as leveduras foram as cepas que apresentaram maior sensibilidade frente aos óleos essenciais. Por esse motivo foram aplicados nos biofilmes duas concentrações diferentes dos óleos essenciais. A menor concentração foi utilizada quando o biofilme isolado ou misto era composto por *C. albicans* e a maior concentração dos óleos para as bactérias, conforme verificado na CMM. As concentrações dos óleos foram para *C. citratus* (0,062 e 0,5%), *T. minuta* (0,78 e 8%), e *C. zedoaria* (3,12 e 6,25%).

Os dados da contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL) transformados em Log_{10} (tratamento e controle) no biofilme, foram submetidos à análise estatística descritiva e teste *t*-

Student utilizando-se o software Minitab (Inc. PA, USA) considerando-se com nível de significância $p \leq 0,05$.

Para a visualização dos microrganismos nos corpos-de-prova com a aplicação o óleo essencial (tratamento) e sem o óleo (controle), os mesmos foram submetidos a microscopia eletrônica de varredura.

5.1 Concentração inibitória e microbicida mínima (CIM e CMM) do óleo essencial de *Cympopogon citratus* (D.C.) Stapf

O óleo essencial de *C. citratus* apresentou atividade bacteriostática em todas as cepas de *Staphylococcus* spp. e *S. mutans*. A CIM foi de 0,25% para 80% das cepas de *S. aureus* e 0,125% para 60% das cepas de *S. epidermidis*. Para *S. mutans*, a concentração do óleo essencial de *C. citratus* a 0,25% inibiu 50% das cepas estudadas. No grupo controle, todas as cepas analisadas apresentaram crescimento microbiano (Tabela 1).

A concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de *C. citratus* foi de 0,062% para 70% das cepas de *C. albicans* e 100% das cepas de *C. tropicalis* e 50% para *C. glabrata* (Tabela 1). No grupo controle, houve crescimento microbiano para todas as cepas estudadas.

Tabela 1 – Porcentagem de cepas dos microrganismos inibidos pelo óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em relação à CIM

Microrganismos	Porcentagem da diluição do óleo essencial de <i>C. citratus</i>								
	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,007
<i>S. aureus</i>	100	100	100	80	20	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	100	100	100	100	60	40	0	0	0
<i>S. mutans</i>	100	100	100	50	40	10	0	0	0
<i>C. albicans</i>	100	100	100	100	100	70	30	0	0
<i>C. tropicalis</i>	100	100	100	100	100	100	80	20	0
<i>C. glabrata</i>	100	100	100	100	100	50	40	10	0

O óleo essencial de *C. citratus* apresentou atividade microbica para todas as cepas avaliadas. A CMM do óleo essencial de *C. citratus* foi 0,5% para 80% das cepas de *S. aureus*, 0,125% para 90% das cepas de *S. epidermidis*, 0,5% para 70% das cepas de *S. mutans*, e 0,125% para 90% das cepas de *C. albicans*, 100% das cepas de *C. tropicalis* e 60% das cepas de *C. glabrata* (Tabela 2).

Tabela 2 – Porcentagem de cepas dos microrganismos inibidos pelo óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em relação à CMM

Microrganismos	Porcentagem da diluição do óleo essencial de <i>C. citratus</i>								
	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,007
<i>S. aureus</i>	100	100	80	20	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	100	100	100	100	90	10	0	0	0
<i>S. mutans</i>	100	100	70	20	10	0	0	0	0
<i>C. albicans</i>	100	100	100	100	90	10	0	0	0
<i>C. tropicalis</i>	100	100	100	100	100	80	20	0	0
<i>C. glabrata</i>	100	100	100	100	60	40	0	0	0

5.2 Efeitos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf sobre biofilme

O óleo essencial de *C. citratus* a 0,062% apresentou atividade antimicrobiana sobre biofilme de *C. albicans* isoladamente ou em associações. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos óleo essencial e controle para os biofilmes formados por *C. albicans* ($p = 0,0001$), *C. albicans* e *S. aureus* ($p = 0,0001$), *C. albicans* e *S. mutans* ($p = 0,0001$), *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* ($p = 0,001$). Esses resultados estão representados na Figura 13.

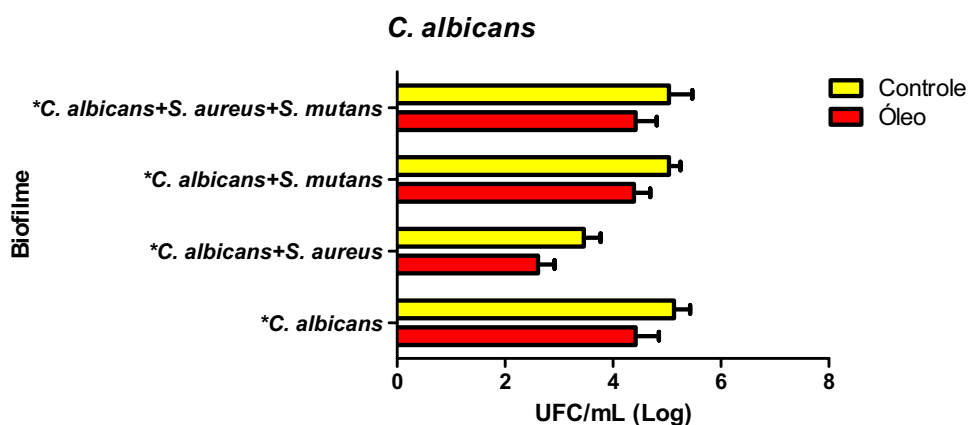


Figura 13 - Médias e Desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) obtidos nos teste de biofilme de *Candida albicans* isolado ou em associações.

* Diferença estatística ($p \leq 0,05$)

O óleo essencial de *C. citratus* a 0,5% apresentou atividade antimicrobiana sobre o biofilme formado por *S. aureus* isoladamente ou em associações. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos óleo essencial e controle para os biofilmes formados por *S. aureus* ($p = 0,0001$), *S. aureus* e *C. albicans* ($p = 0,001$), *S. aureus* e *S. mutans* e ($p = 0,0001$), *S. aureus*, *C. albicans* e *S. mutans* ($p = 0,0001$). Esses resultados estão representados na Figura 14.

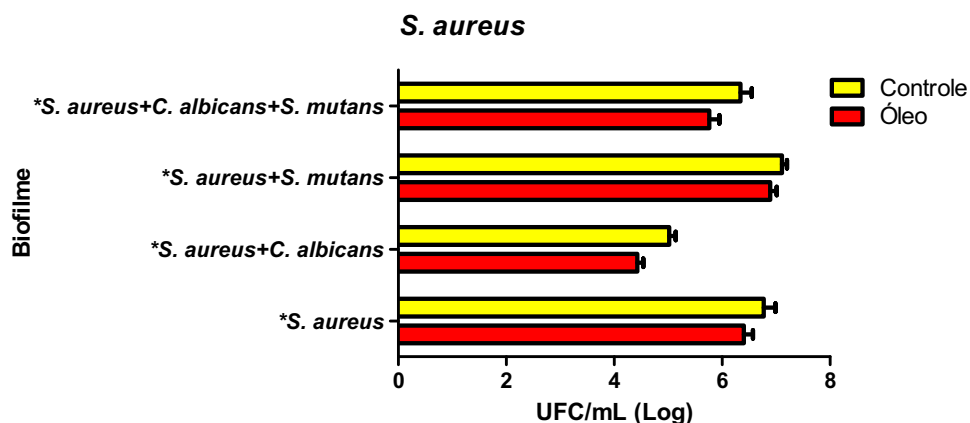


Figura 14 - Médias e Desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) obtidos nos teste de aderência de *S. aureus* isolado ou em associações.

* Diferença estatística ($p \leq 0,05$)

Na figura 15 observa-se que o óleo essencial de *C. citratus* a 0,5% apresentou atividade antimicrobiana em biofilme de *S. mutans* formado isoladamente ou em associações. Houve diferença estatisticamente significante entre os grupos óleo essencial e controle para os biofilmes formados por *S. mutans* ($p = 0,0001$), *S. mutans* e *C. albicans* ($p = 0,004$), *S. mutans* e *S. aureus* ($p = 0,013$). Nas associações de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* não houve diferença estatisticamente significante ($p = 0,461$). Esses resultados estão representados na Figura 15.

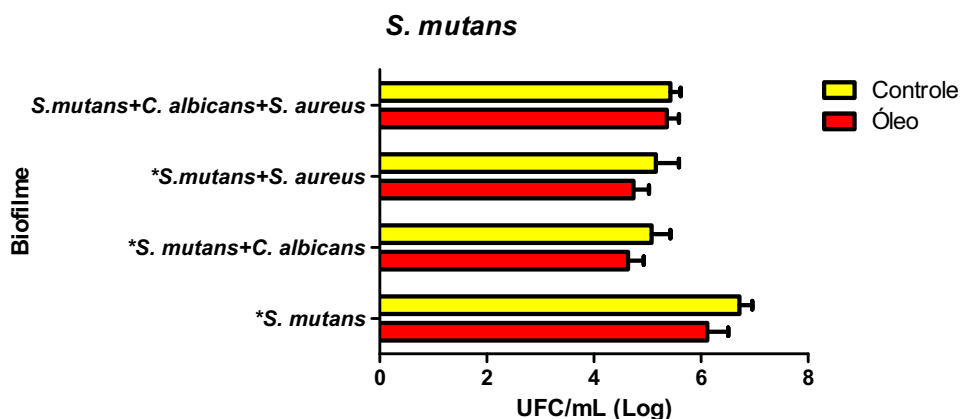


Figura 15 – Médias e Desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) obtidos nos teste de aderência de *S. mutans* isolado ou em associações.

* Diferença estatística ($p \leq 0,05$)

Analisando todos os grupos controles, pode-se observar que *C. albicans* e *S. aureus* apresentaram maior número de UFC/mL quando o biofilme foi formado pelo microrganismo isolado em relação ao biofilme formado pela associação desses dois microrganismos. Entretanto, quando foi realizada associações de *Candida albicans* e *S. aureus* com *S. mutans*, o número de UFC/mL foi semelhante ao biofilme isolado (Figura 15).

5.3 Visualização em MEV dos efeitos do óleo essencial de *C. citratus* no biofilme

Após a avaliação dos dados em UFC/mL e a análise estatística, foram realizados testes de aderência em corpos-de-prova em resina acrílica para a visualização em microscopia eletrônica de varredura de acordo com os grupos experimentais. Nas análises produzidas por MEV foi possível visualizar a aderência no diferentes grupos experimentais utilizando o tratamento com o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (Figuras 16 a 22).

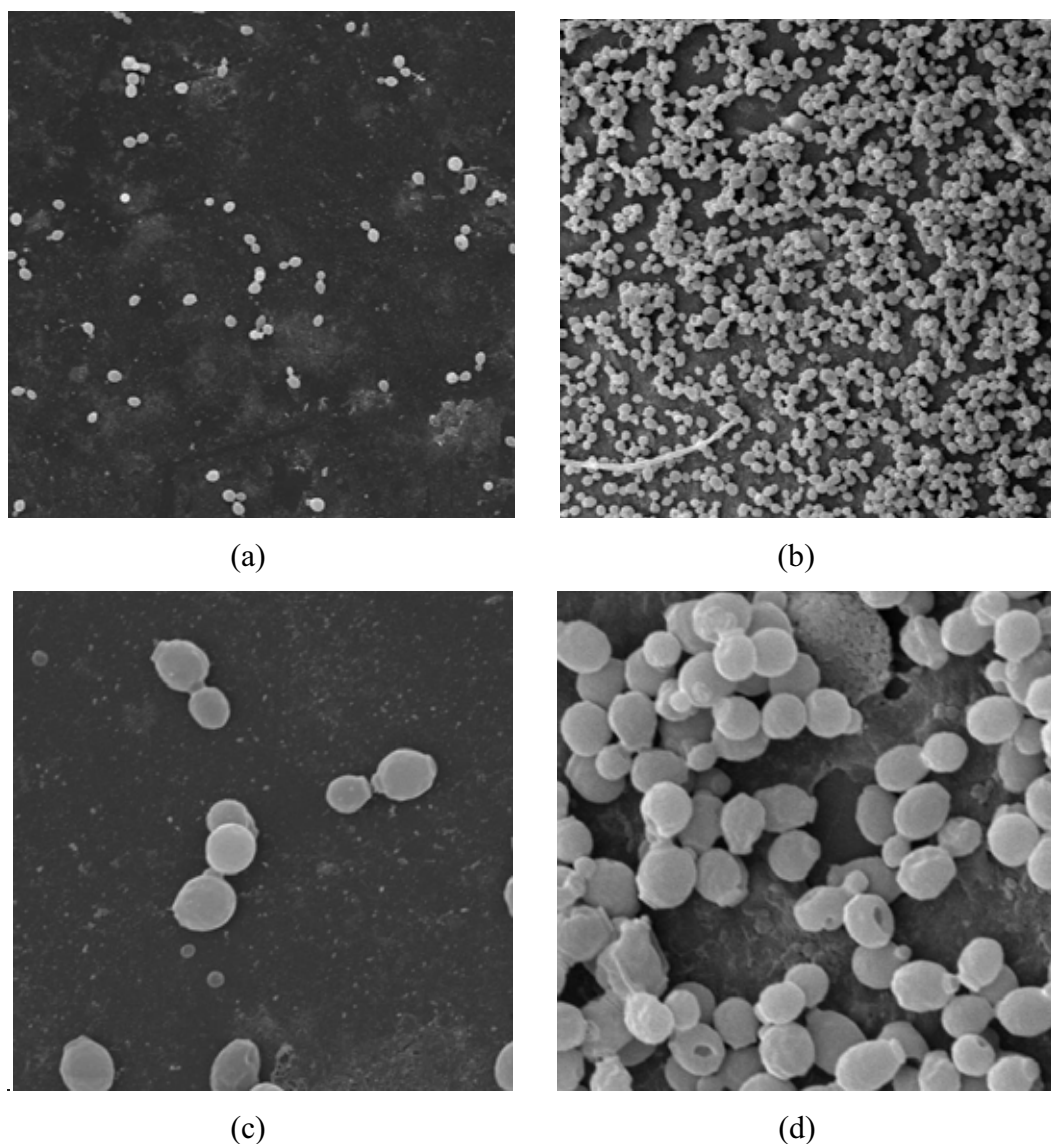


Figura 16 – MEV de biofilmes de *C. albicans* (G1) em corpos-de-prova de resina acrílica após 5 dias de crescimento. (a) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *C. citratus* à 0,062% por 5 min, aumento 1000x; (b) MEV do corpo-de-prova do controle aumento 1000x; (c) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com o óleo essencial de *C. citratus*, aumento 5000x; (d) MEV do corpo-de-prova do controle, aumento 5000x. Observa-se diferenças entre os tratamentos (Figuras 16a e 16c) em relação ao controle (Figuras 16b e 16d) e na camada mais interna a visualização de polisacarídeos extracelulares (Figura 16d).

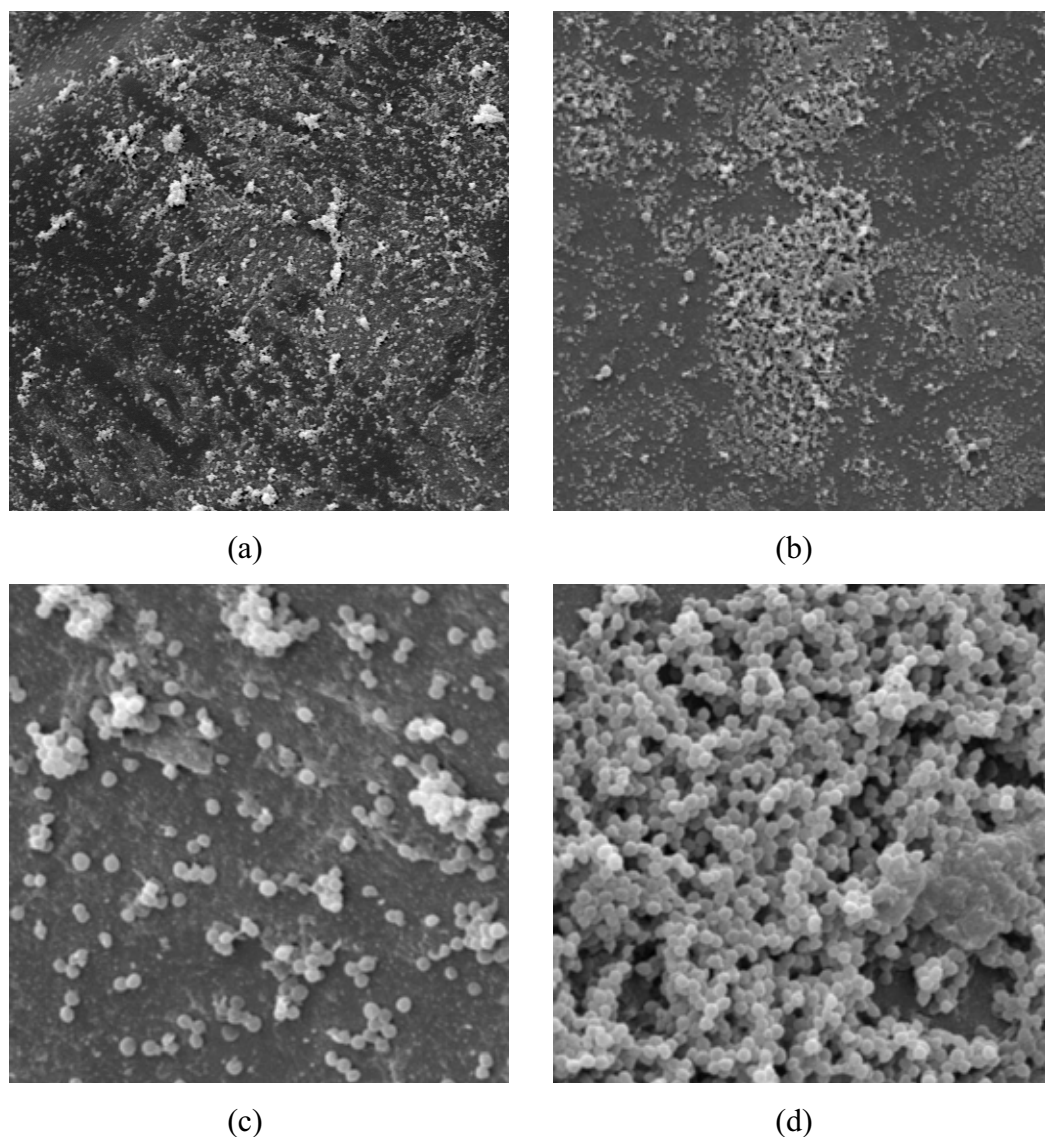


Figura 17 – MEV de biofilmes de *S. aureus* (G2) em corpos-de-prova de resina acrílica após 5 dias de crescimento. (a) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *C. citratus* à 0,5% por 5 min, aumento 1000x; (b) MEV do corpo-de-prova do controle aumento 1000x; (c) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com o óleo essencial de *C. citratus*, aumento 5000x; (d) MEV do corpo-de-prova do controle, aumento 5000x. As Figuras 17a e 17c mostram uma redução no número de células. Observa-se que na Figura 17d mostra um aglomerado de células.

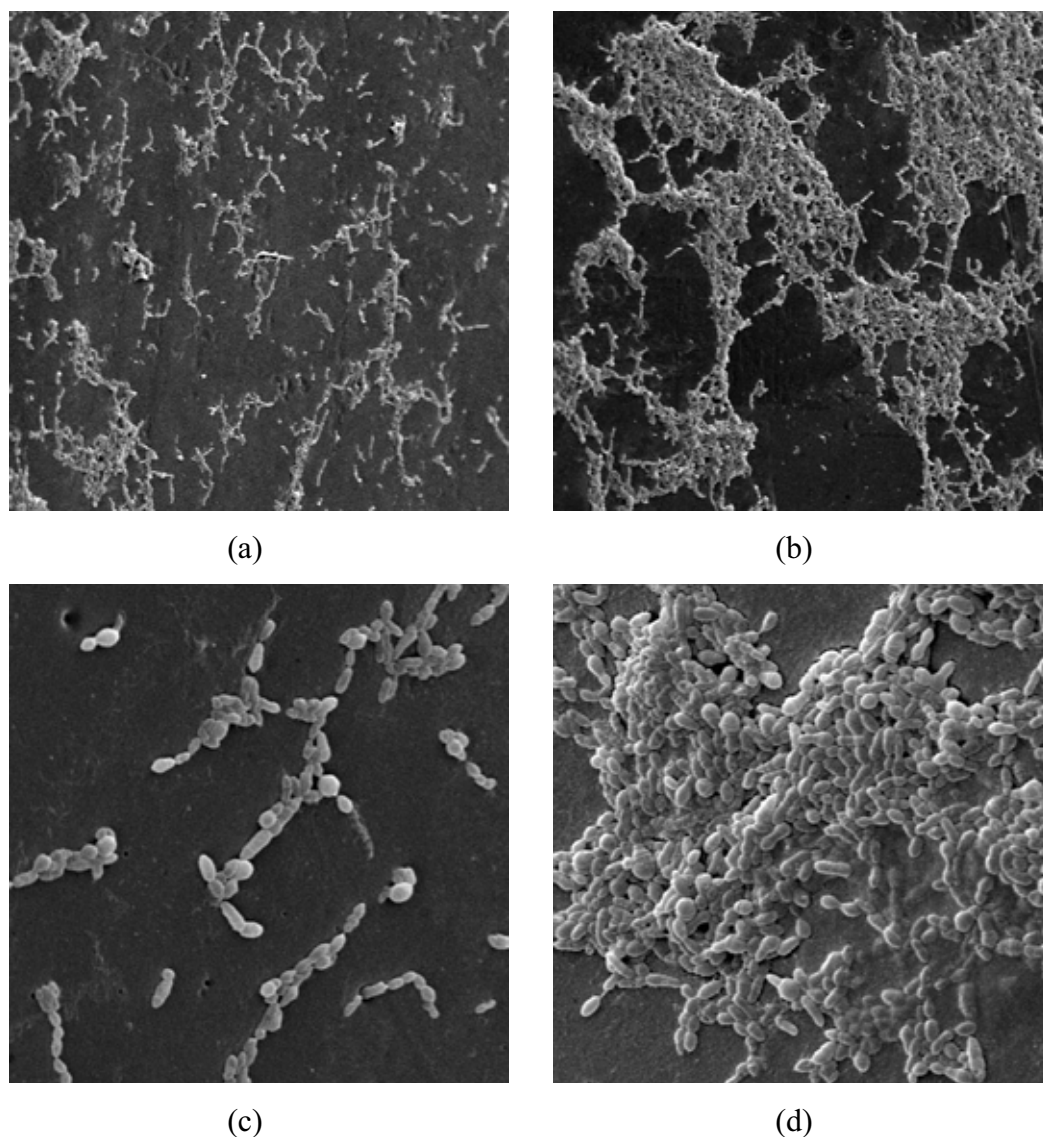


Figura 18 – MEV de biofilmes de *S. mutans* (G3) em corpos-de-prova de resina acrílica após 5 dias de crescimento. (a) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *C. citratus* à 0,5% por 5 min, aumento 1000x; (b) MEV do corpo-de-prova do controle aumento 1000x; (c) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com o óleo essencial de *C. citratus*, aumento 5000x; (d) MEV do corpo-de-prova do controle, aumento 5000x. Visualiza-se redução do número de células após o tratamento em relação ao controle.

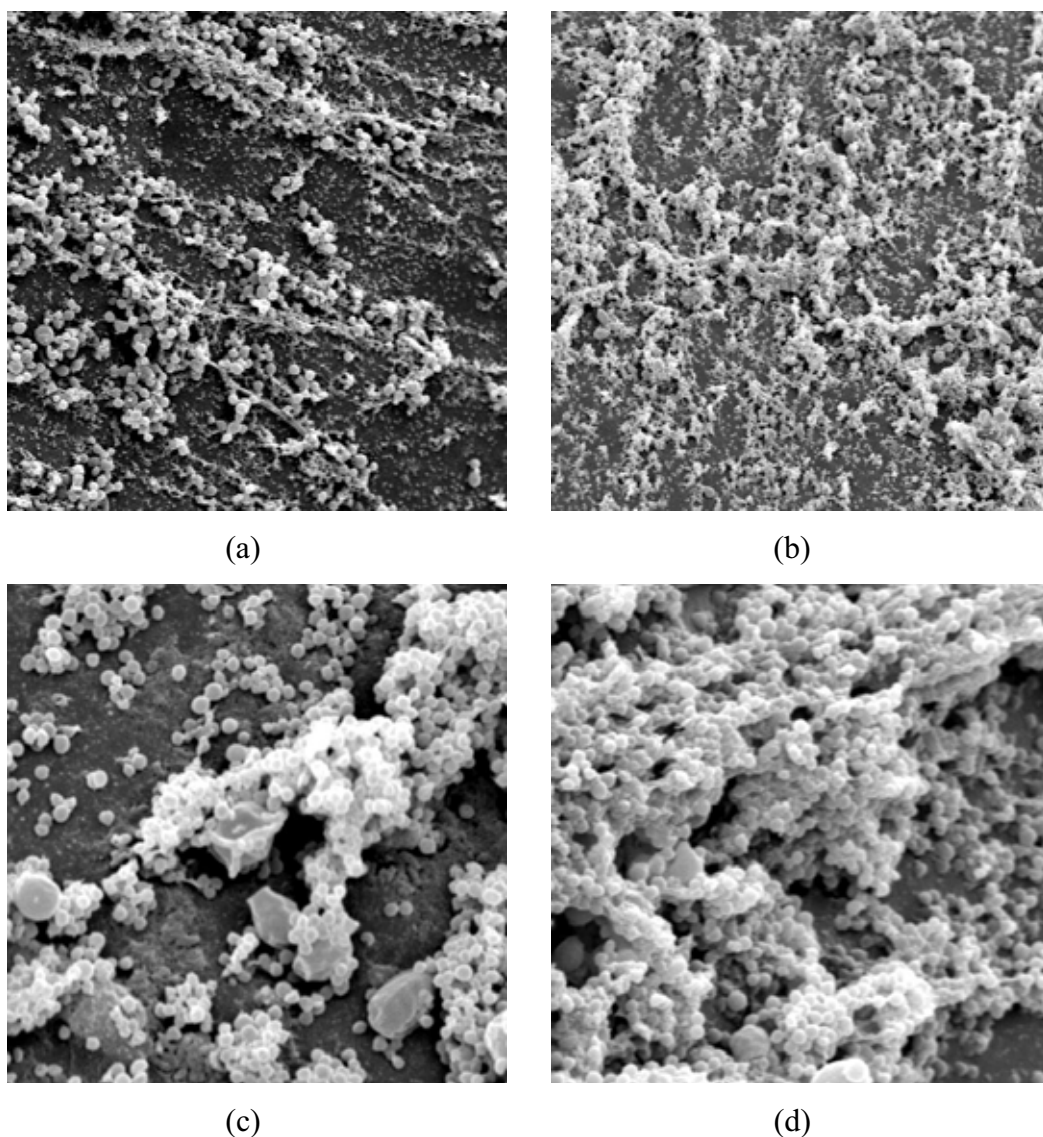


Figura 19 – MEV de biofilmes em associações de *C. albicans* e *S. aureus* (G4) em corpos-de-prova de resina acrílica após 5 dias de crescimento. (a) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *C. citratus* à 0,062% por 5 min, aumento 1000x; (b) MEV do corpo-de-prova do controle aumento 1000x; (c) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com o óleo essencial de *C. citratus*, aumento 5000x; (d) MEV do corpo-de-prova do controle, aumento 5000x. Observa-se uma pequena redução do número de células (Figuras 19a e 19c).

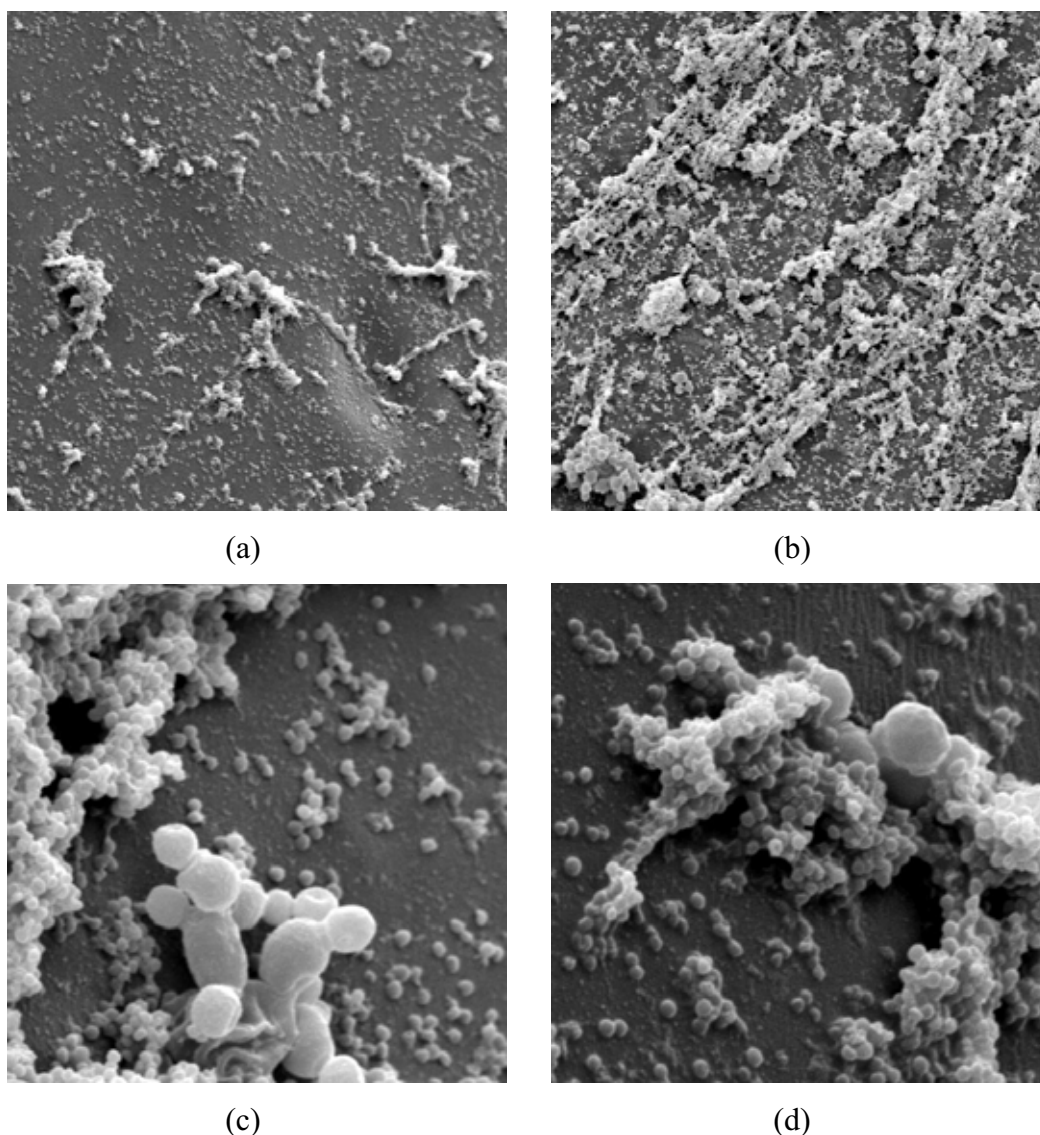


Figura 20 – MEV de biofilmes em associações de *C. albicans* e *S. aureus* (G4) em corpos-de-prova de resina acrílica após 5 dias de crescimento. (a) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *C. citratus* à 0,5% por 5 min, aumento 1000x; (b) MEV do corpo-de-prova do controle aumento 1000x; (c) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com o óleo essencial de *C. citratus*, aumento 5000x; (d) MEV do corpo-de-prova do controle, aumento 5000x. Com o aumento da concentração do óleo essencial teve uma diminuição do número de células (Figuras 20a e 20c) com relação ao controle (Figuras 20b e 20d). Pode-se também comparar em relação às Figuras 19a e 19c.

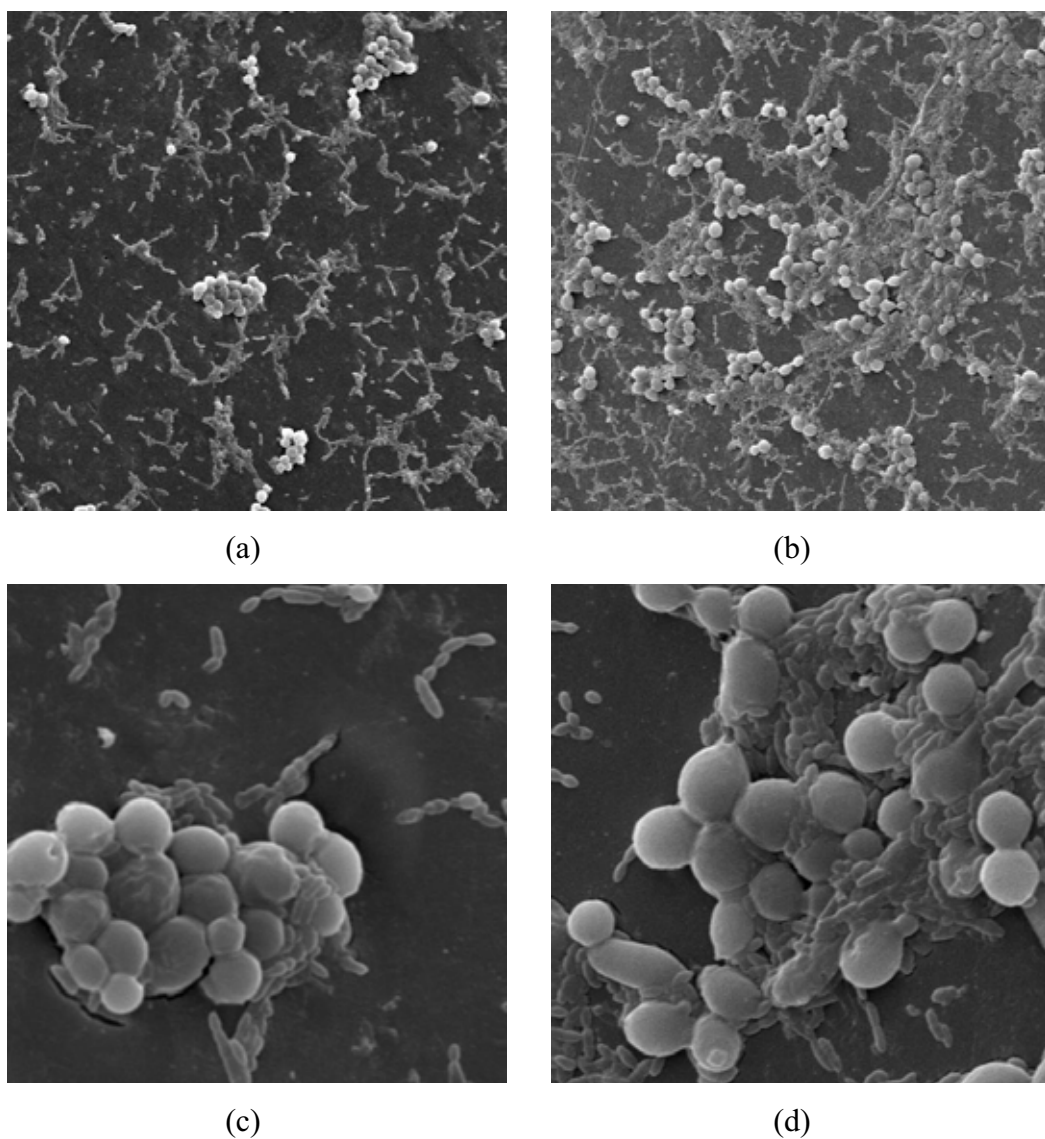


Figura 21 – MEV de biofilmes em associações de *C. albicans* e *S. mutans* (G5) em corpos-de-prova de resina acrílica após 5 dias de crescimento. (a) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *C. citratus* à 0,5% por 5 min, aumento 1000x; (b) MEV do corpo-de-prova do controle aumento 1000x; (c) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com o óleo essencial de *C. citratus*, aumento 5000x; (d) MEV do corpo-de-prova do controle, aumento 5000x. Observa-se uma redução do número de células (Figuras 21a e 21c).

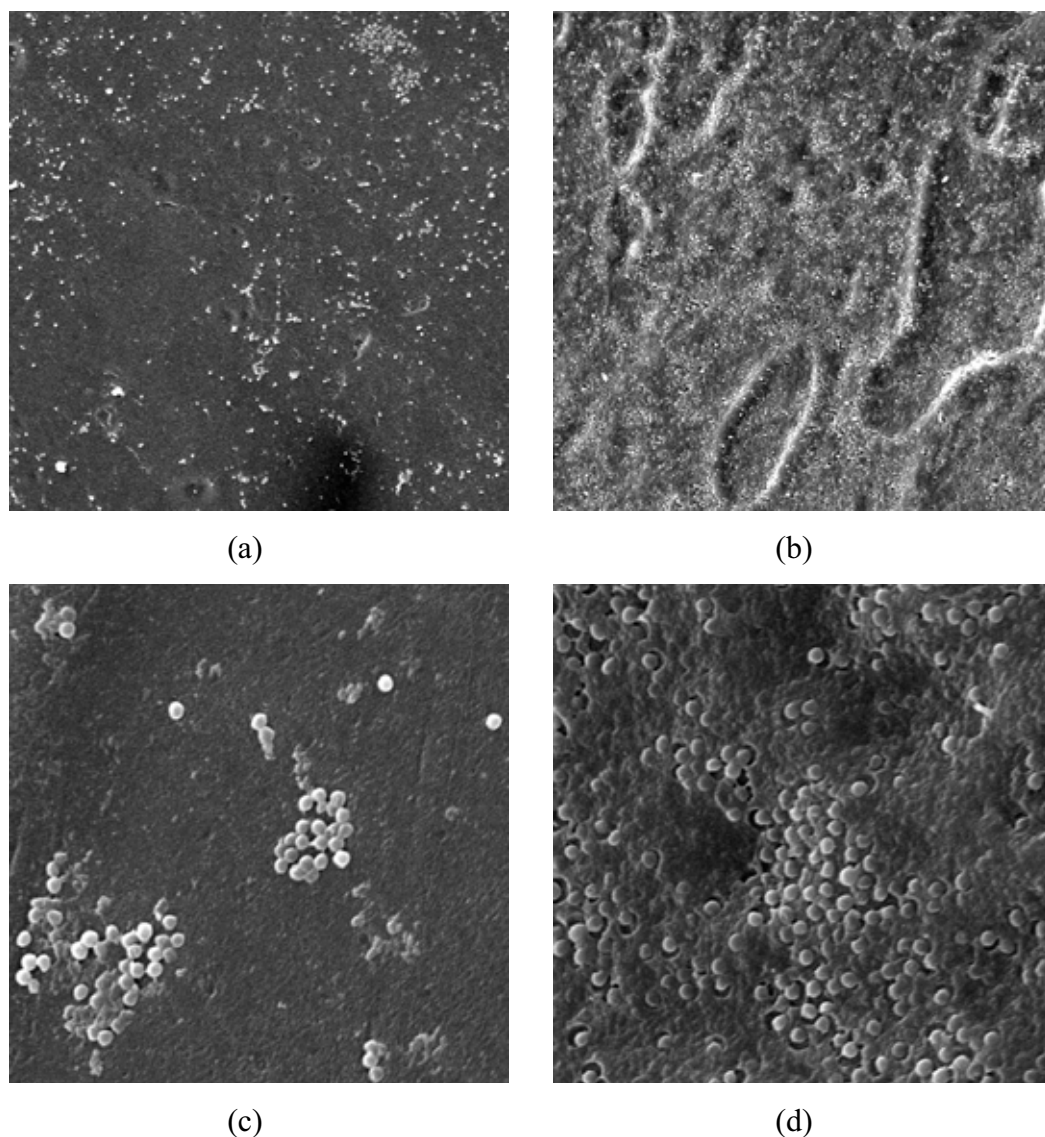


Figura 22 – MEV de biofilmes em associações de *S. mutans* e *S. aureus* (G6) em corpos-de-prova de resina acrílica após 5 dias de crescimento. (a) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *C. citratus* à 0,5% por 5 min, aumento 1000x; (b) MEV do corpo-de-prova do controle aumento 1000x; (c) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com o óleo essencial de *C. citratus*, aumento 5000x; (d) MEV do corpo-de-prova do controle, aumento 5000x. Na Figura 29d pode-se observar a formação de grande quantidade de polissacarídeos extracelulares entre as células microbianas.

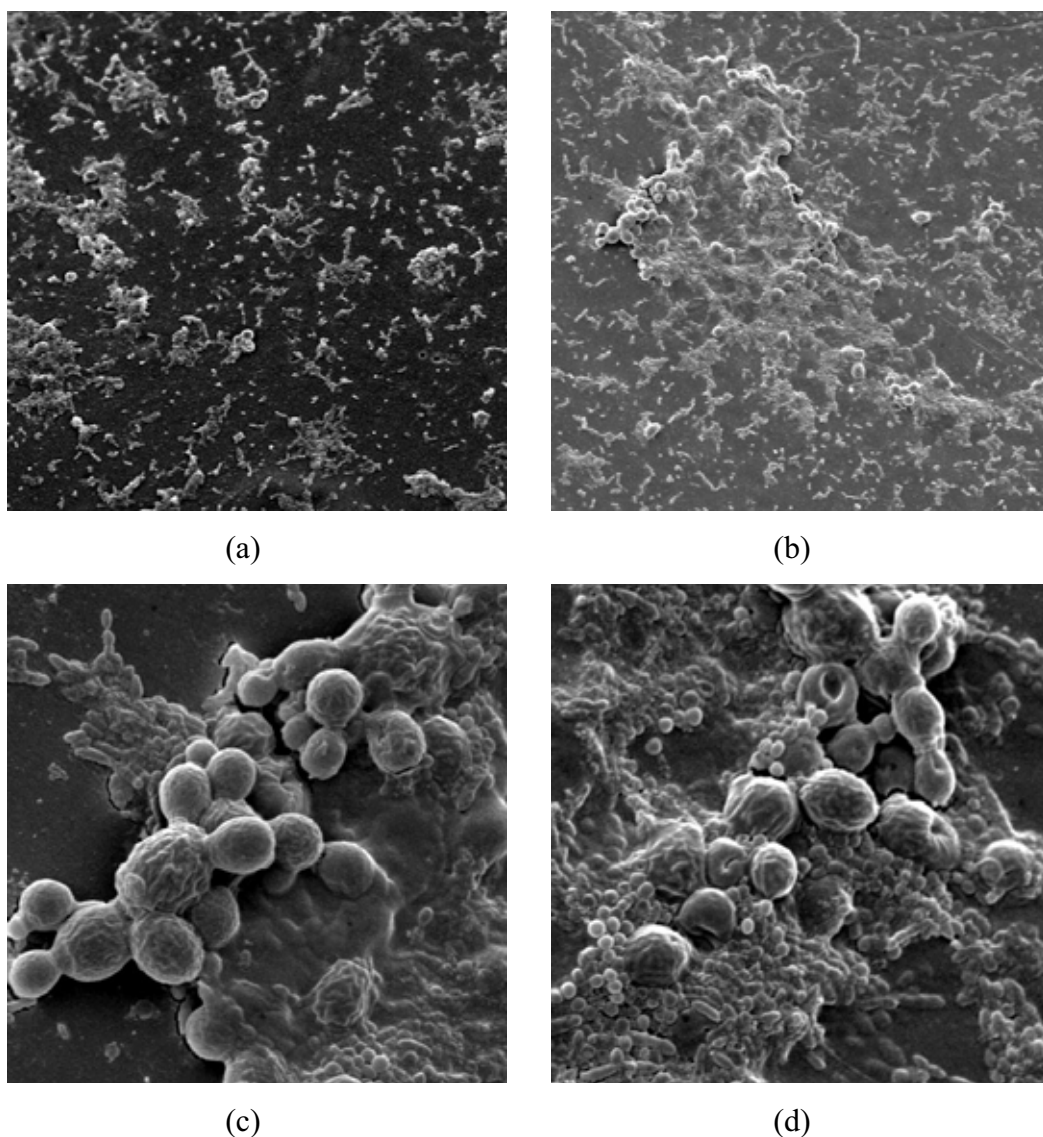


Figura 23 – MEV de biofilmes em associações de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* (G7) em corpos-de-prova de resina acrílica após 5 dias de crescimento. (a) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *C. citratus* à 0,5% por 5 min, aumento 1000x; (b) MEV do corpo-de-prova do controle aumento 1000x; (c) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com o óleo essencial de *C. citratus*, aumento 5000x; (d) MEV do corpo-de-prova do controle, aumento 5000x. Observa-se nas Figuras 23c e 23d a formação de polissacarídeos extracelulares entre as células microbianas.

5.4 Concentração inibitória e microbicida mínima (CIM e CMM) do óleo essencial de *Tagetes minuta* L.

Atividade bacteriostática também foi encontrada a partir do óleo essencial de *T. minuta* em todas as cepas de *Staphylococcus* spp. e *S. mutans*. A CIM foi de 2% para 80% das cepas de *S. aureus* e para 70% das cepas de *S. epidermidis*. Para *S. mutans*, a concentração do óleo essencial de *T. minuta* a 4% inibiu 70% das cepas de *S. mutans* estudadas.

Para as cepas de *Candida* spp. avaliadas, também, observou-se atividade fungistática para o óleo essencial de *T. minuta*. A concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de *T. minuta* foi de 0,39% para 100% das cepas de *C. albicans*. No entanto, 70% das cepas de *C. tropicalis* apresentaram inibição a 1% do óleo, já para as cepas de *C. glabrata*, 70% delas apresentaram CIM de 2% (Tabela 3).

Tabela 3 – Porcentagem de cepas dos microrganismos inibidos pelo óleo essencial de *Tagetes minuta* em relação à CIM

Microrganismos	Porcentagem da diluição do óleo essencial de <i>T. minuta</i>								
	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031
<i>S. aureus</i>	100	100	80	20	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	100	100	70	30	0	0	0	0	0
<i>S. mutans</i>	100	70	30	0	0	0	0	0	0
<i>C. tropicalis</i>	100	100	100	70	20	10	0	0	0
<i>C. glabrata</i>	100	100	70	20	10	0	0	0	0

A CMM do óleo essencial de *T. minuta* a 4% foi efetivo para 80% das cepas de *S. aureus*, para 70% das cepas de *S. epidermidis*, 8% para 70% das cepas de *S. mutans*, e 0,78% para 100% das cepas de *Candida albicans*, 2% para 70% das cepas de *C. tropicalis* e para 50% das cepas de *C. glabrata* (Tabela 4).

Tabela 4 – Porcentagem de cepas dos microrganismos inibidos pelo óleo essencial de *Tagetes minuta* em relação à CMM

Microrganismos	Porcentagem da diluição do óleo essencial de <i>T. minuta</i>								
	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031
<i>S. aureus</i>	100	80	20	0	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	100	70	30	0	0	0	0	0	0
<i>S. mutans</i>	70	30	10	0	0	0	0	0	0
<i>C. tropicalis</i>	100	100	70	20	10	0	0	0	0
<i>C. glabrata</i>	100	100	50	30	20	0	0	0	0

5.5 Efeitos do óleo essencial de *Tagetes minuta* sobre biofilme

Foi utilizado o óleo essencial de *Tagetes minuta* a 0,78% sobre biofilme de *C. albicans*, o mesmo apresentou atividade antimicrobiana isoladamente ou em associações dos microrganismos. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos óleo essencial e controle para os biofilmes formados por *C. albicans* ($p = 0,0001$), *C. albicans* e *S. aureus* ($p = 0,0001$), *C. albicans* e *S. mutans* ($p = 0,0001$), *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* ($p = 0,001$). Esses resultados estão representados na Figura 24.

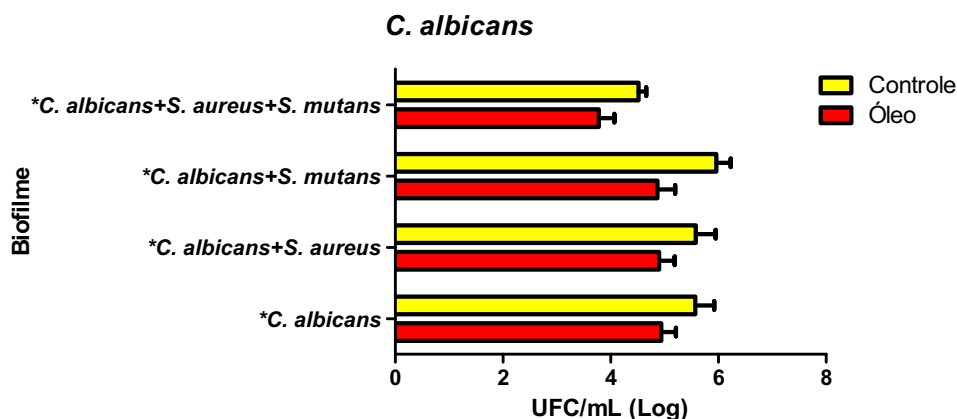


Figura 24- Médias e Desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) obtidos nos teste de biofilme de *Candida albicans* isolado ou em associações.

* Diferença estatística ($p \leq 0,05$)

No biofilme formado por *S. aureus* isoladamente ou em associações foi utilizado a óleo essencial de *T. minuta* a 8%. Houve diferença estatisticamente significante entre os grupos óleo essencial e controle para os biofilmes formados por *S. aureus* ($p = 0,004$), *S. aureus* e *S. mutans* e ($p = 0,001$), *S. aureus*, *C. albicans* e *S. mutans* ($p = 0,0001$). Com exceção do grupo *S. aureus* e *C. albicans* ($p = 0,372$). Esses resultados estão representados na Figura 25 .

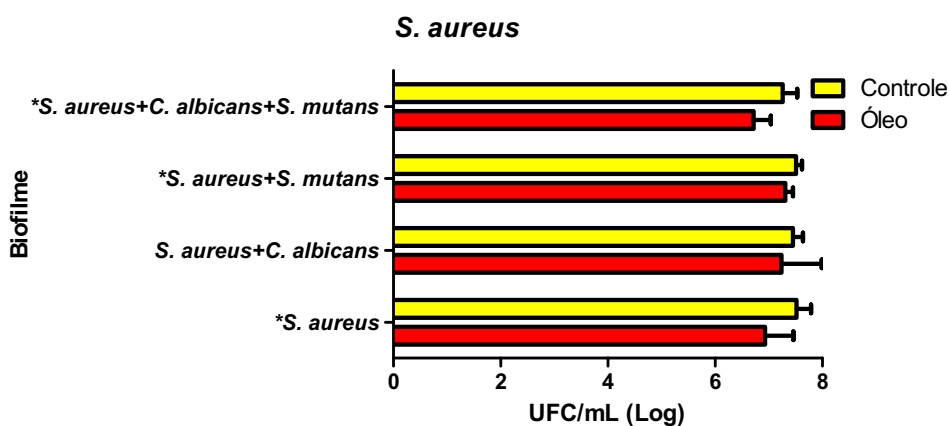


Figura 25- Médias e Desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) obtidos nos teste de aderência de *S. aureus* isolado ou em associações.

* Diferença estatística ($p \leq 0,05$)

A mesma diluição do óleo essencial de *T. minuta* a 8% foi aplicados no biofilme de *S. mutans* isoladamente ou em associações. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos óleo essencial e controle para os biofilmes formados por *S. mutans* ($p = 0,0001$), *S. mutans* e *Candida albicans* ($p = 0,0001$), *S. mutans* e *S. aureus* ($p = 0,011$) e nas associações de *Candida albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* ($p = 0,0001$). Esses resultados estão representados na Figura 26.

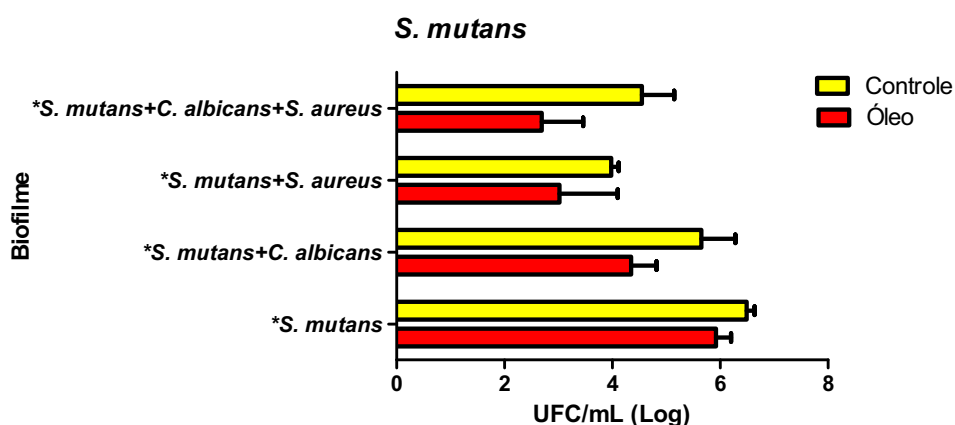


Figura 26 – Médias e Desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) obtidos nos teste de aderência de *S. mutans* isolado ou em associações.

* Diferença estatística ($p \leq 0,05$)

Analisando todos os grupos, pode-se observar que o biofilme formado por *S. mutans* apresentou maior número de UFC/mL quando o biofilme foi formado pelo microrganismo isolado (Figura 26)

5.6 Visualização em MEV dos efeitos do óleo essencial de *T. minuta* no biofilme

Foram realizados testes de aderência em corpos-de-prova em resina acrílica para a visualização em microscopia eletrônica de varredura de acordo com os grupos experimentais. Através das análises

produzidas por MEV foi possível visualizar a aderência no diferentes grupos experimentais utilizando o tratamento com o óleo essencial de *Tagetes minuta* L. (Figuras 27 a 36).

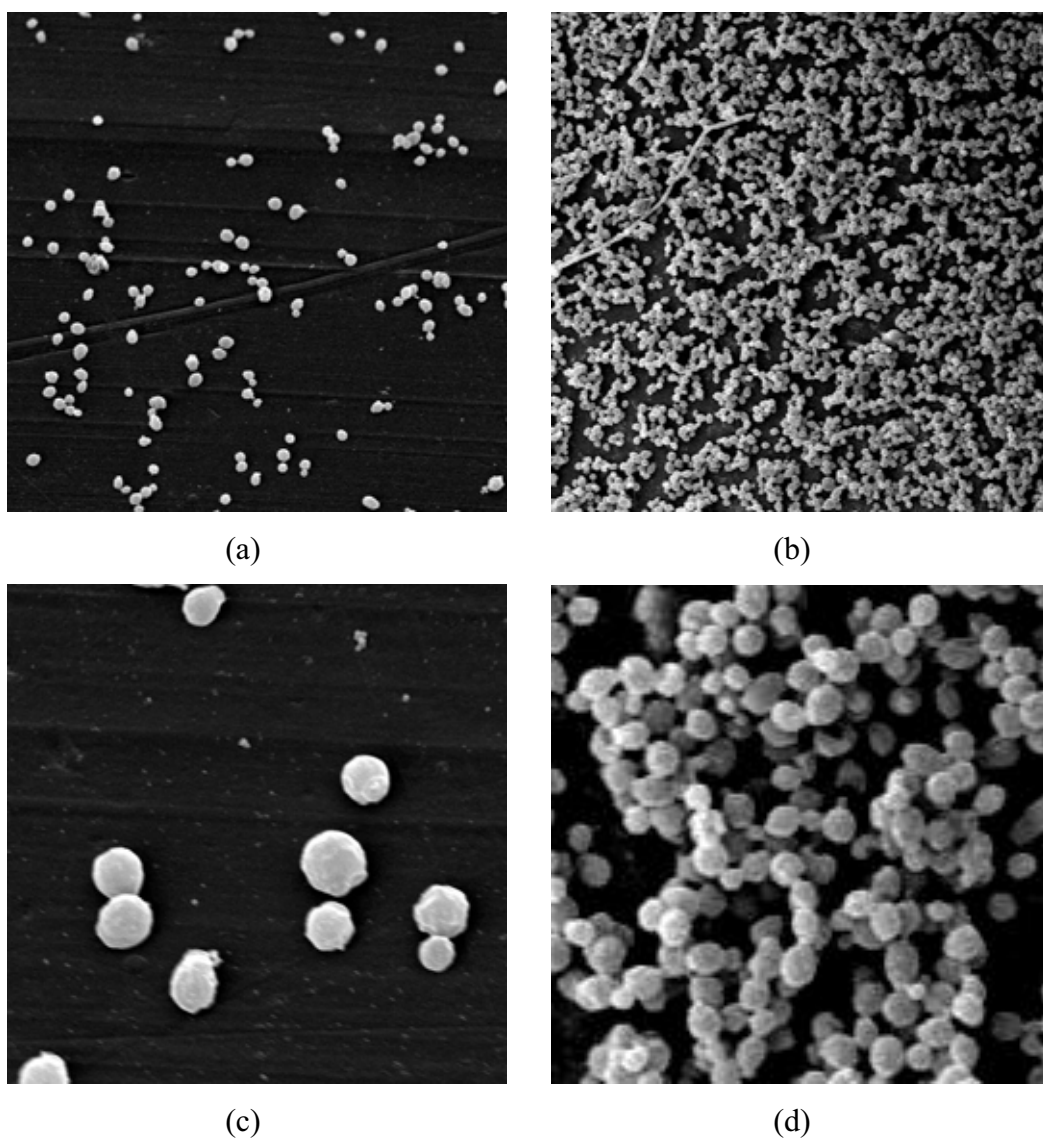


Figura 27 – MEV de biofilmes de *C. albicans*, (G1) em corpos-de-prova em resina acrílica após 5 dias de crescimento. (a) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *T. minuta* à 0,78% por 5 min, aumento 1000x; (b) MEV do corpo-de-prova do controle aumento 1000x; (c) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com o óleo essencial de *T. minuta*, aumento 5000x; (d) MEV do corpo-de-prova do controle, aumento 5000x. Observa-se redução no número de microrganismo (Figura 27c e 27d).

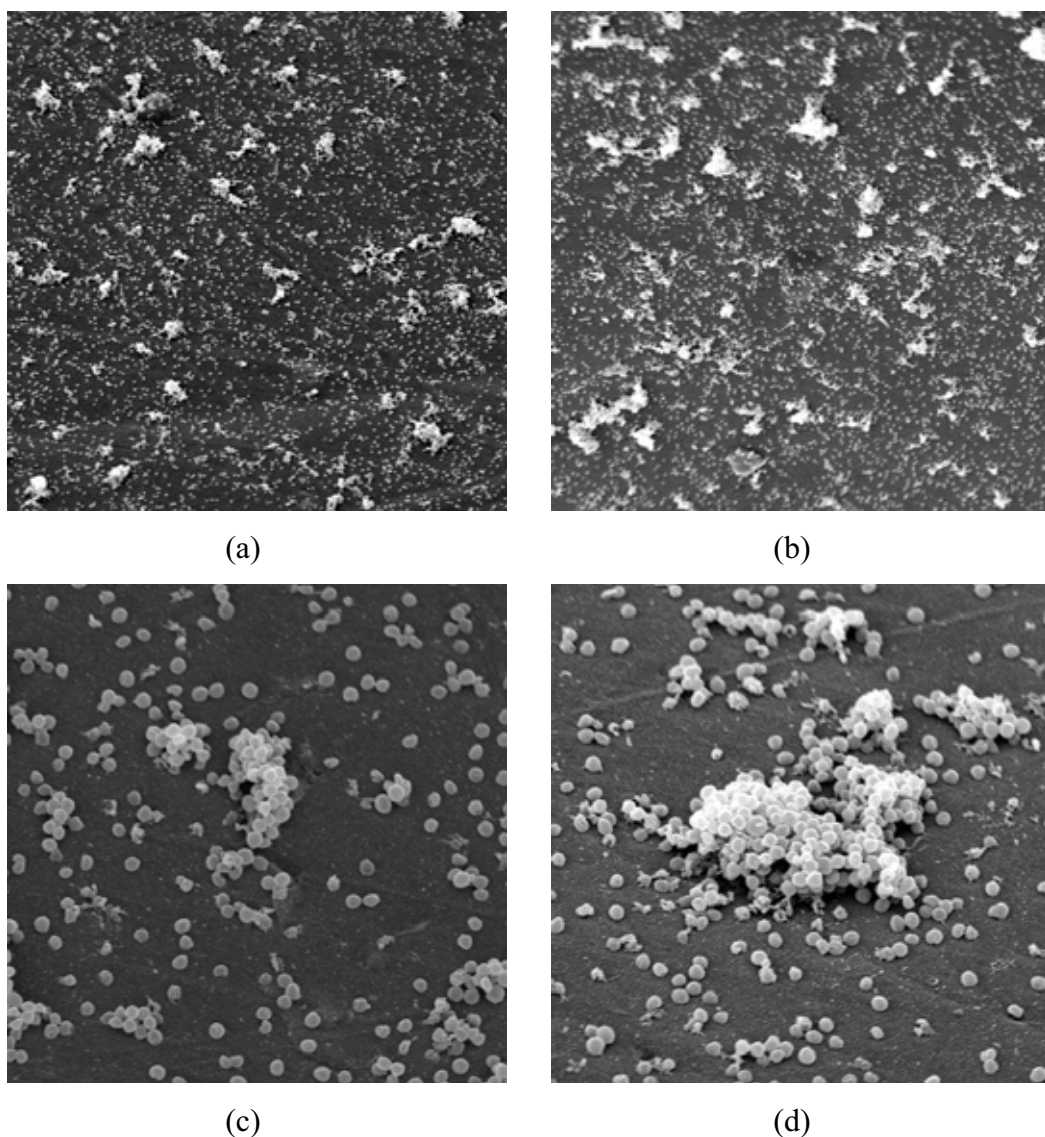


Figura 28 – MEV de biofilmes de *S. aureus* (G2) em corpos-de-prova em resina acrílica após 5 dias de crescimento. (a) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *T. minuta* à 8% por 5 min, aumento 1000x; (b) MEV do corpo-de-prova do controle aumento 1000x; (c) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com o óleo essencial de *T. minuta*, aumento 5000x; (d) MEV do corpo-de-prova do controle, aumento 5000x. Ocorreu pequena diminuição de microrganismo na Figura 28a e 28c para Figura 28b e 28d.

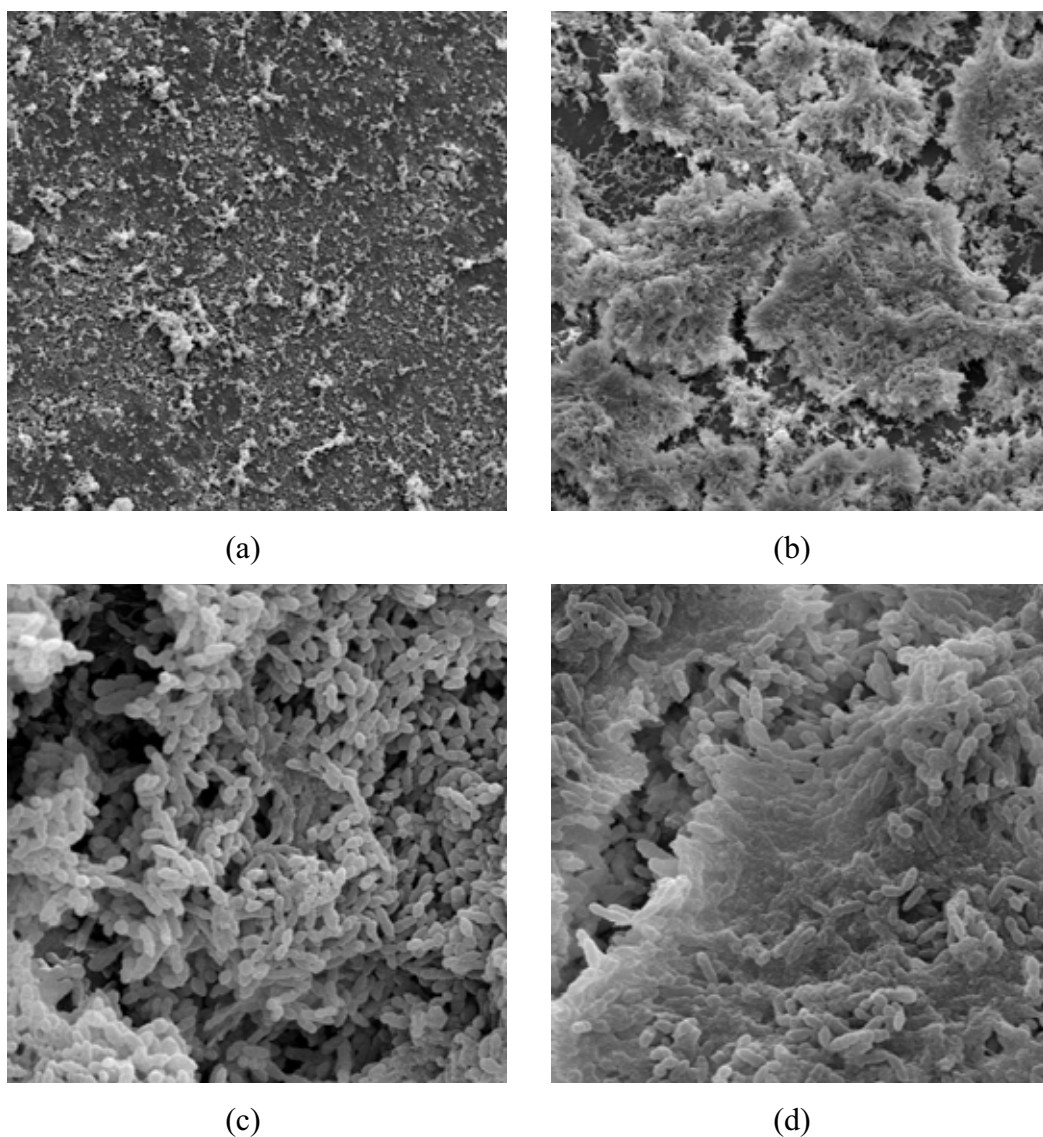


Figura 29 – MEV de biofilmes de *S. mutans* (G3) em corpos-de-prova de resina acrílica após 5 dias de crescimento. (a) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *T. minuta* à 8% por 5 min, aumento 1000x; (b) MEV do corpo-de-prova do controle aumento 1000x; (c) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com o óleo essencial de *T. minuta*, aumento 5000x; (d) MEV do corpo-de-prova do controle, aumento 5000x. Observa-se nas figuras a formação de um biofilme mais espesso. Não foi possível observar redução após o tratamento com o óleo essencial, embora se observa que na Figura 29c os microrganismos estão menos compactados em relação a Figura 29d.

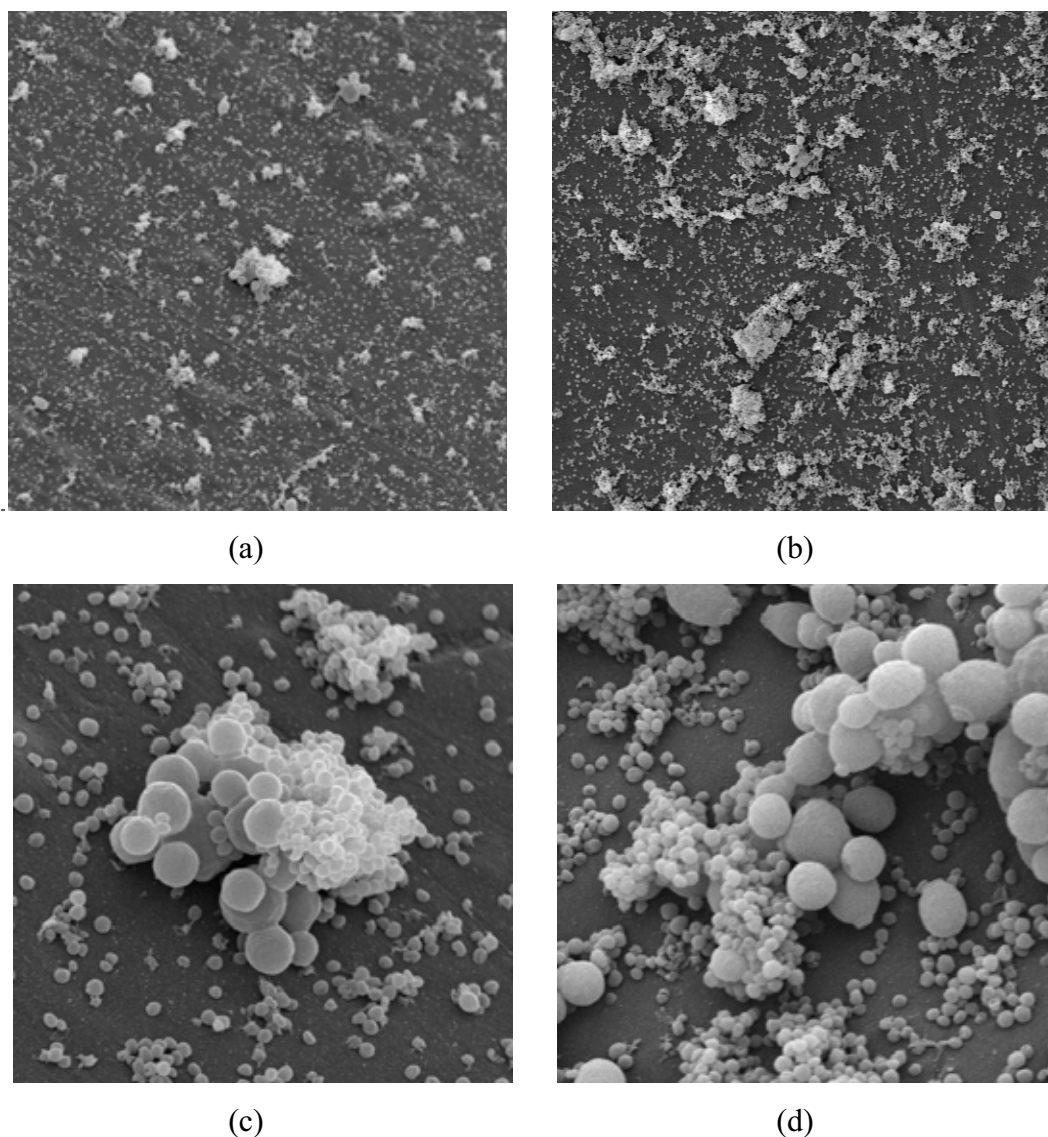


Figura 30 – MEV de biofilmes em associações de *C. albicans* e *S. aureus* (G4) em corpos-de-prova de resina acrílica após 5 dias de crescimento. (a) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *T. minuta* à 0,78% por 5 min, aumento 1000x; (b) MEV do corpo-de-prova do controle aumento 1000x; (c) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com o óleo essencial de *T. minuta*, aumento 5000x; (d) MEV do corpo-de-prova do controle, aumento 5000x. Observa-se um aglomerado das células fúngicas e bacterianas (Figuras 30c e 30d).

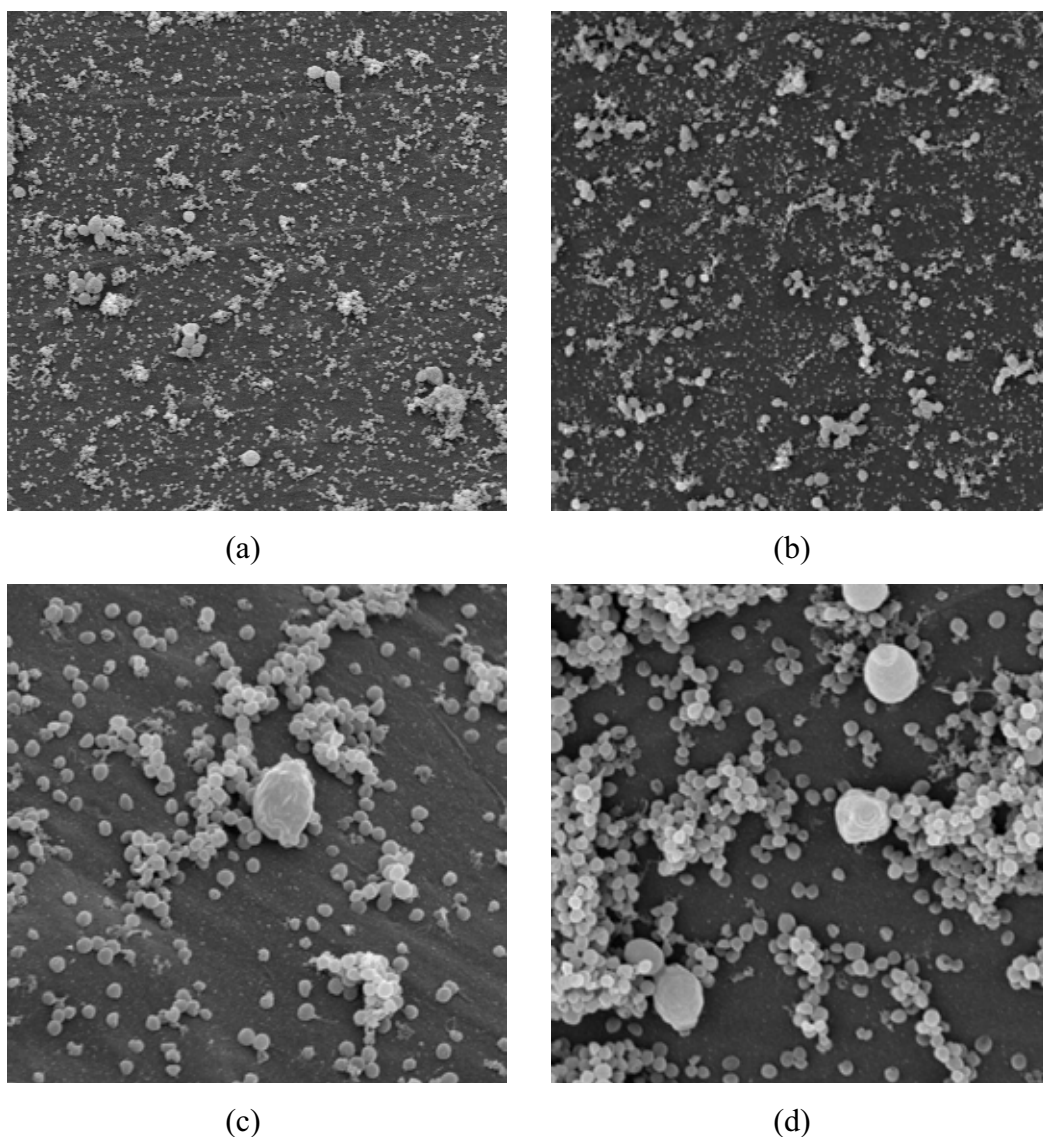


Figura 31 – MEV de biofilmes em associações de *C. albicans* e *S. aureus* (G4) em corpos-de-prova de resina acrílica após 5 dias de crescimento. (a) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *T. minuta* à 8% por 5 min, aumento 1000x; (b) MEV do corpo-de-prova do controle aumento 1000x; (c) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com o óleo essencial de *T. minuta*, aumento 5000x; (d) MEV do corpo-de-prova do controle, aumento 5000x. Observa-se maior quantidade de *C. albicans* e *S. aureus* no grupo controle (Figura 31d), entretanto a análise estatística não foi significativa para *S. aureus*.

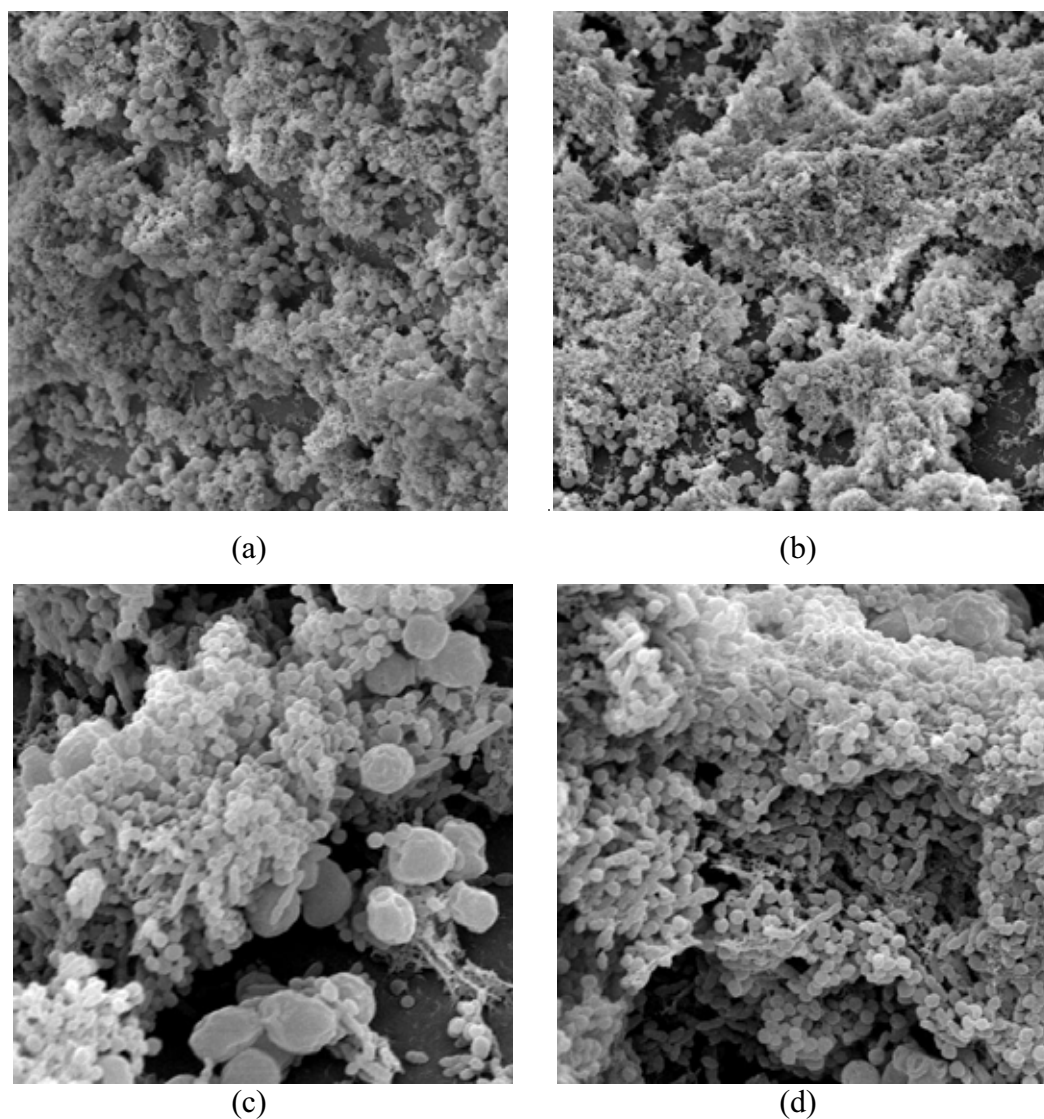


Figura 32 – MEV de biofilmes em associações de *C. albicans* e *S. mutans* (G5) em corpos-de-prova em resina acrílica após 5 dias de crescimento. (a) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *T. minuta* à 0,78% por 5 min, aumento 1000x; (b) MEV do corpo-de-prova do controle aumento 1000x; (c) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com o óleo essencial de *T. minuta*, aumento 5000x; (d) MEV do corpo-de-prova do controle, aumento 5000x. Observa-se que na concentração utilizada o óleo teve pouca redução no número de células, embora a análise estatística foi significativa (Figura 32c).

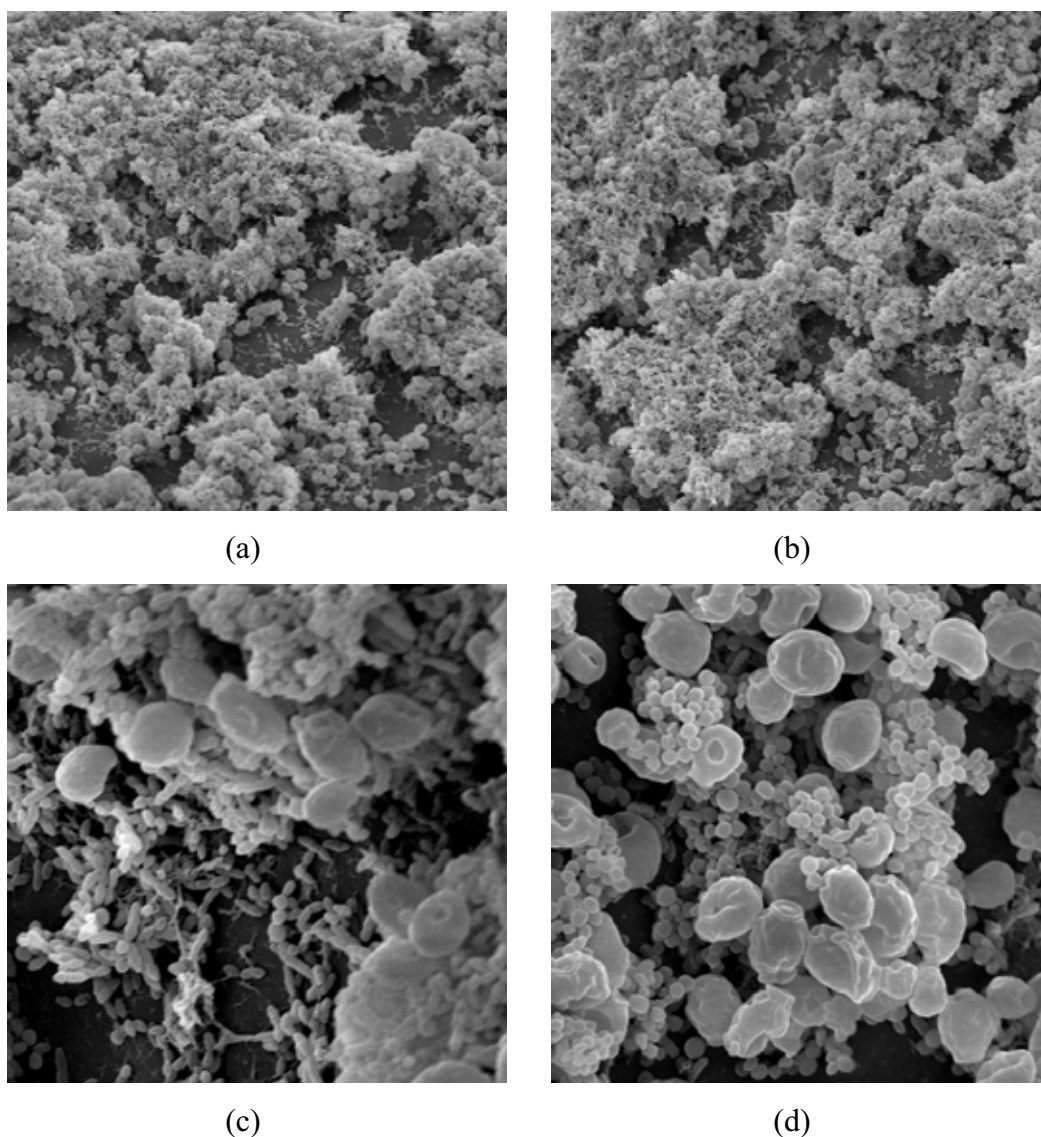


Figura 33 – MEV de biofilmes em associações de *C. albicans* e *S. mutans* (G5) em corpos-de-prova em resina acrílica após 5 dias de crescimento. (a) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *T. minuta* à 8% por 5 min, aumento 1000x; (b) MEV do corpo-de-prova do controle aumento 1000x; (c) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com o óleo essencial de *T. minuta*, aumento 5000x; (d) MEV do corpo-de-prova do controle, aumento 5000x. Com relação a Figura 32c observa-se que na Figura 33c teve uma maior redução no número de células devido à maior concentração do óleo essencial de *T. minuta* a 8%.

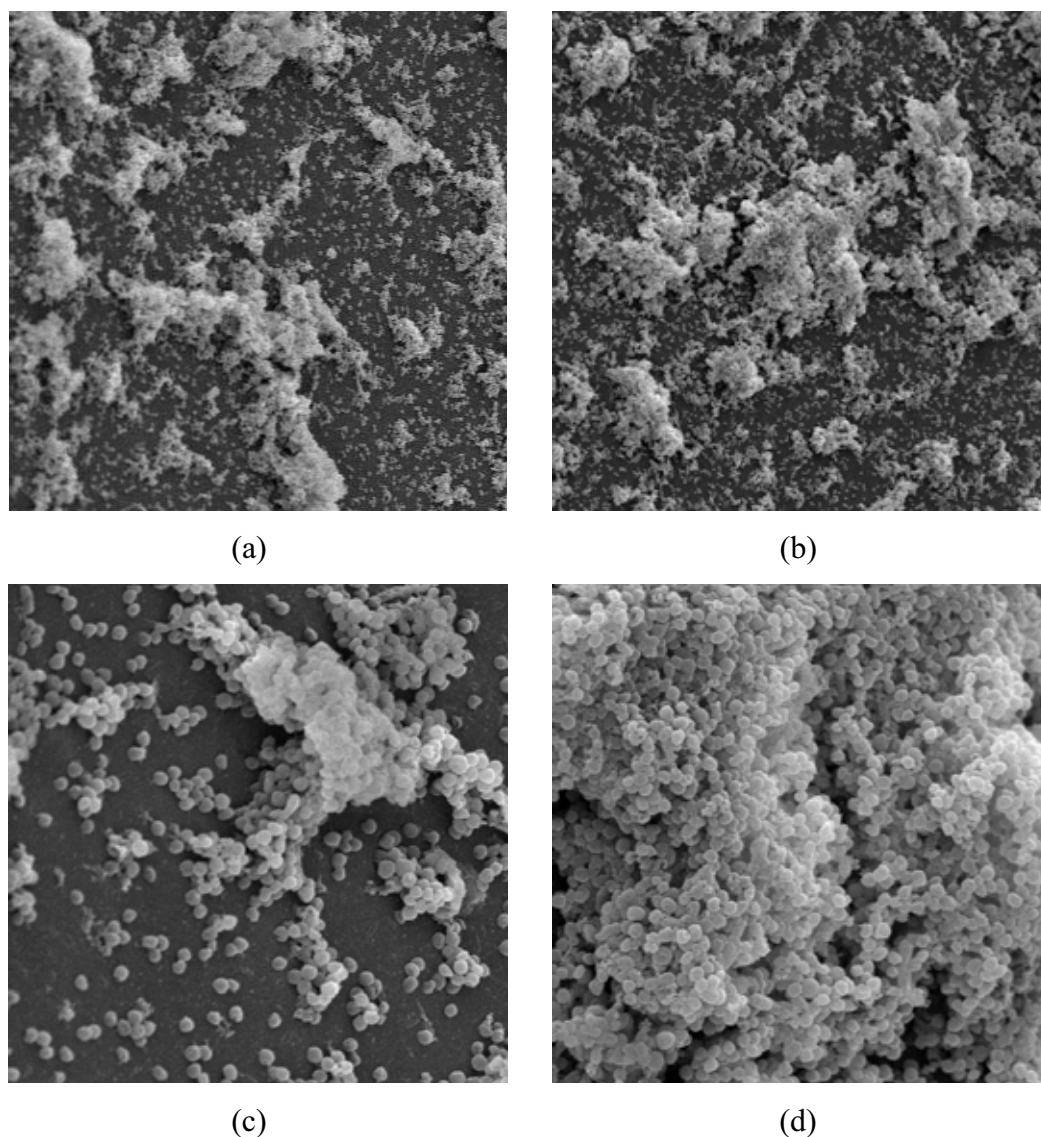


Figura 34 – MEV de biofilmes em associações de *S. mutans* e *S. aureus* (G6) em corpos-de-prova em resina acrílica após 5 dias de crescimento. (a) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *T. minuta* à 8% por 5 min, aumento 1000x; (b) MEV do corpo-de-prova do controle aumento 1000x; (c) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com o óleo essencial de *T. minuta*, aumento 5000x; (d) MEV do corpo-de-prova do controle, aumento 5000x. A Figura 34d apresenta uma camada espessa e volumosa de células bacterianas em relação a Figura 34c.

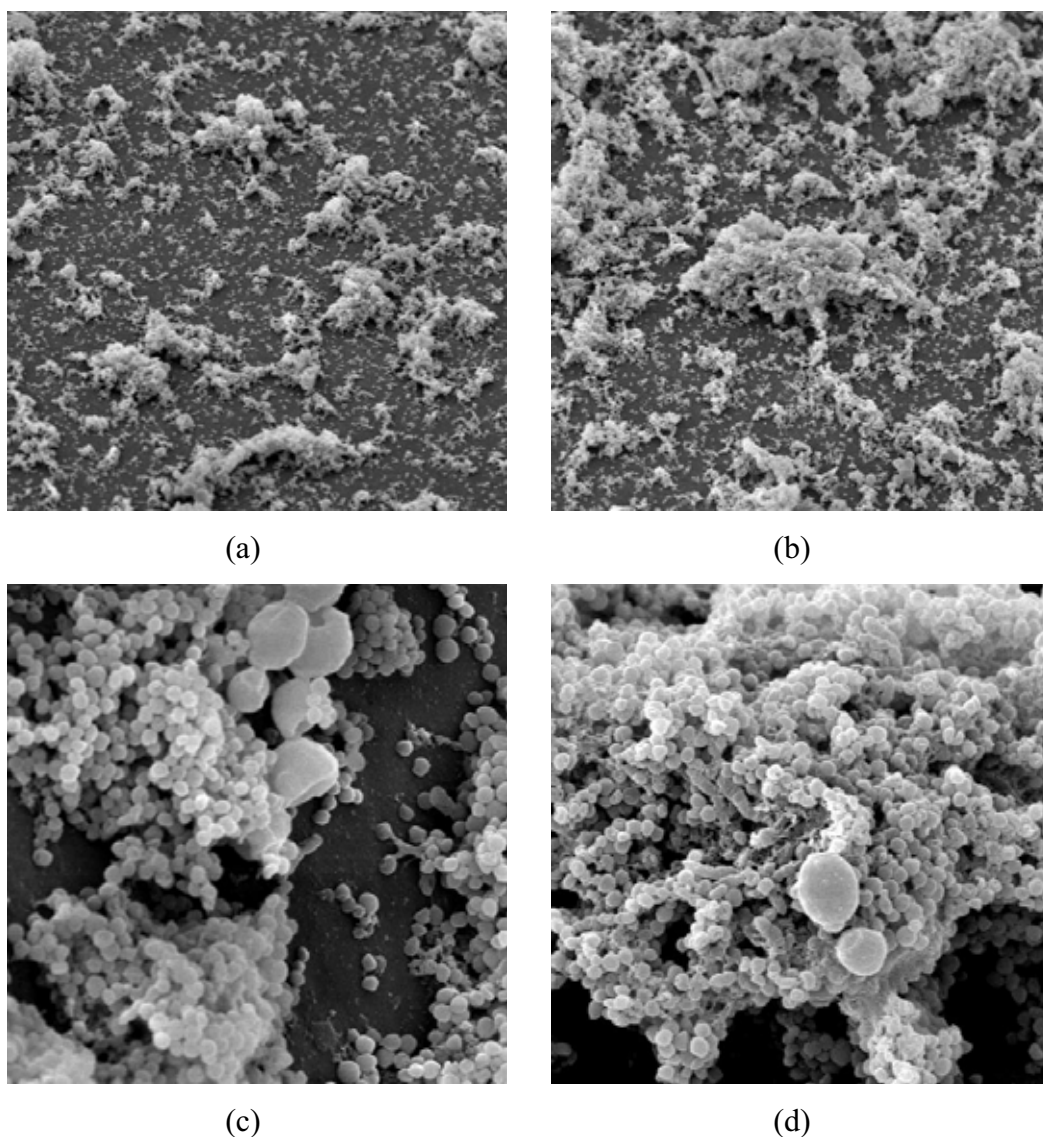


Figura 35 – MEV de biofilmes em associações de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* (G7) em corpos-de-prova em resina acrílica após 5 dias de crescimento. (a) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *T. minuta* à 0,78% por 5 min, aumento 1000x; (b) MEV do corpo-de-prova do controle aumento 1000x; (c) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com o óleo essencial de *T. minuta* aumento 5000x; (d) MEV do corpo-de-prova do controle, aumento 5000x. Observa-se um aglomerado de células microbianas na Figura 35d com relação a Figura 35c.

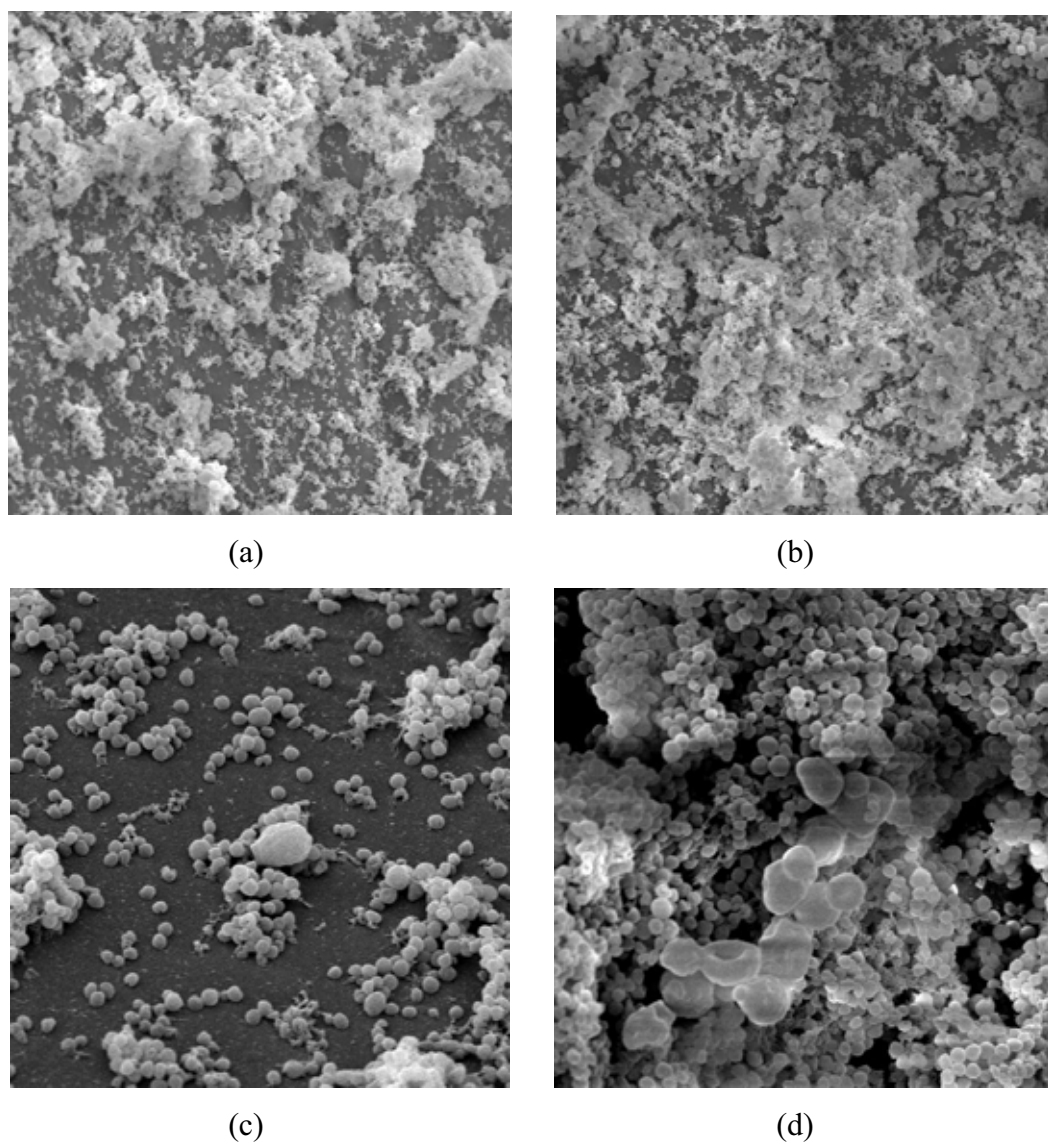


Figura 36 – MEV de biofilmes em associações de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* (G7) em corpos-de-prova em resina acrílica após 5 dias de crescimento. (a) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *T. minuta* à 8% por 5 min, aumento 1000x; (b) MEV do corpo-de-prova do controle aumento 1000x; (c) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com o óleo essencial de *T. minuta*, aumento 5000x; (d) MEV do corpo-de-prova do controle, aumento 5000x. Observa-se uma redução do número de células bacterianas e fúngicas (Figura 36c) em relação a Figura 35c.

5.7 Concentração inibitória e microbicida mínima (CIM e CMM) do óleo essencial de *Curcuma zedoaria* Roscoe

O óleo essencial de *C. zedoaria* apresentou CIM de 6,25% para 50% das cepas de *S. aureus* e para 30% das cepas de *S. epidermidis*. Para *S. mutans*, a concentração do óleo essencial de *C. zedoaria* a 12,5% inibiu 40% das cepas estudadas (Tabela 5).

Para as leveduras do gênero *Candida* avaliadas, também, apresentaram atividade fungistática para o óleo essencial de *C. zedoaria*. A concentração inibitória mínima do óleo essencial de *C. zedoaria* foi de 0,78% para 70% das cepas de *C. albicans*. As cepas de *C. tropicalis* e *C. glabrata* na diluição 12,5% do óleo apresentaram inibição de 50 e 40% respectivamente. No grupo controle houve crescimento microbiano para todas as cepas estudadas.

Tabela 5 – Porcentagem de cepas dos microrganismos inibidos pelo óleo essencial de *C. zedoaria* em relação à CIM

Microrganismos	Porcentagem da diluição do óleo essencial de <i>C. zedoaria</i>								
	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19	0,09
<i>S. aureus</i>	100	100	50	20	20	10	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	100	60	30	10	0	0	0	0	0
<i>S. mutans</i>	40	40	10	10	0	0	0	0	0
<i>C. albicans</i>	100	100	100	100	100	70	30	0	0
<i>C. tropicalis</i>	100	50	40	10	0	0	0	0	0
<i>C. glabrata</i>	100	40	30	30	0	0	0	0	0

A CMM do óleo essencial de *C. zedoaria* foi 12,5% para 50% das cepas de *S. aureus*, 25% para 60% das cepas de *S. epidermidis*, 50% para 40% das cepas de *S. mutans* e 3,12% para 70% das cepas de *Candida albicans*. Nas cepas de *C. tropicalis* e *C. glabrata* 50 e 40% respectivamente apresentaram efeito fungicida a 25% do óleo essencial (Tabela 6). Ocorreu crescimento em todas as cepas analisadas em todas as diluições.

Tabela 6 – Porcentagem de cepas dos microrganismos inibidos pelo óleo essencial de *C. zedoaria* em relação à CMM

Microrganismos	Porcentagem da diluição do óleo essencial de <i>C. zedoaria</i>								
	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19
<i>S. aureus</i>	100	100	50	20	20	10	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	100	60	30	10	0	0	0	0	0
<i>S. mutans</i>	40	40	10	10	0	0	0	0	0
<i>C. albicans</i>	100	100	100	100	70	20	10	0	0
<i>C. tropicalis</i>	100	50	40	10	0	0	0	0	0
<i>C. glabrata</i>	100	40	30	30	0	0	0	0	0

5.8 Efeitos do óleo essencial de *Curcuma zedoaria* sobre biofilme

No tratamento do biofilme com o óleo essencial de *C. zedoaria* a 3,12% sobre *C. albicans* isoladamente ou em associações apresentou reduções significativas. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos óleo essencial e controle para os biofilmes formados por *C. albicans* ($p = 0,001$), *C. albicans* e *S. aureus* ($p = 0,034$), *Candida albicans* e *S. mutans* ($p = 0,0001$), *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* ($p = 0,001$). Esses resultados estão representados na Figura 37.

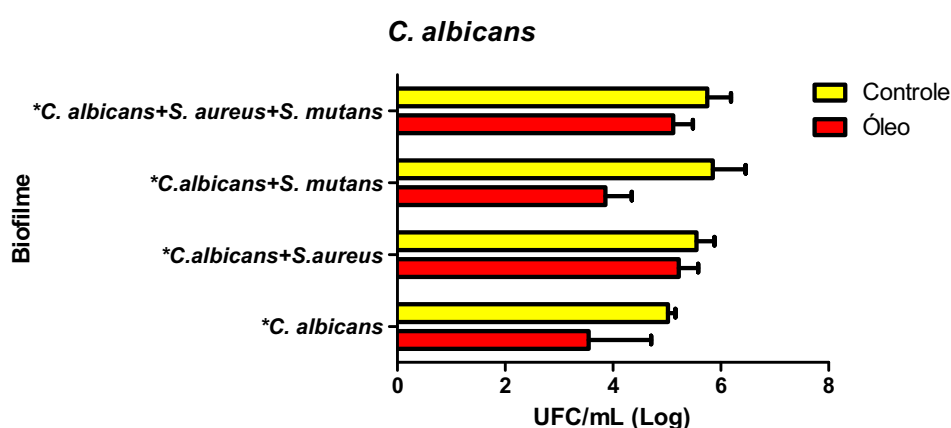


Figura 37 - Médias e Desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) obtidos nos teste de biofilme de *Candida albicans* isolado ou em associações.

* Diferença estatística ($p \leq 0,05$)

O óleo essencial de *C. zedoaria* a 6,25% apresentou atividade antimicrobiana sobre o biofilme formado por *S. aureus* isoladamente ou em associações. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos óleo essencial e controle para os biofilmes formados por *S. aureus* ($p = 0,025$), *S. aureus* e *C. albicans* ($p = 0,006$). Para os grupos formados *S. aureus* e *S. mutans* ($p = 0,063$), *S. aureus*, *C. albicans* e *S. mutans* ($p = 0,264$) não houve diferença estatisticamente. Esses resultados estão representados na Figura 38.

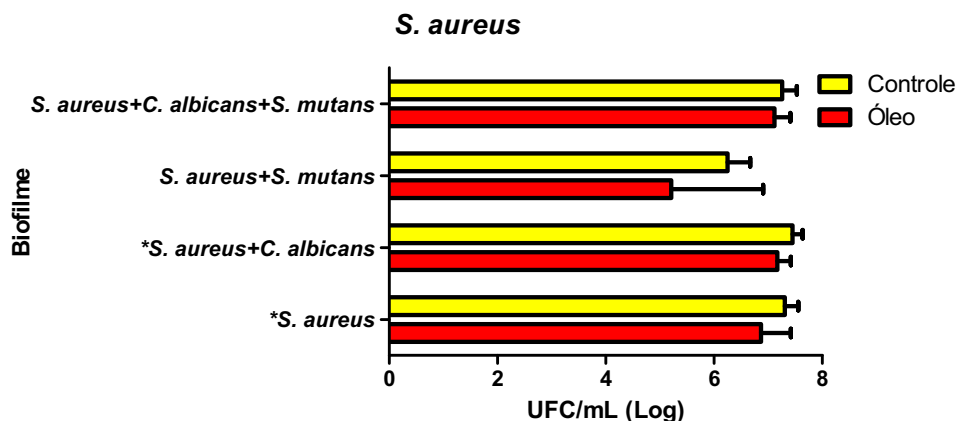


Figura 38 - Médias e Desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) obtidos nos teste de aderência de *S. aureus* isolado ou em associações.

* Diferença estatística ($p \leq 0,05$)

O óleo essencial de *C. zedoaria* a 3,12% apresentou atividade antimicrobiana no biofilme isoladamente ou em associações de *S. mutans*. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos óleo essencial e controle para os biofilmes formados por *S. mutans* ($p = 0,0001$), *S. mutans* e *C. albicans* ($p = 0,0001$), *S. mutans* e *S. aureus* ($p = 0,0001$), *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* ($p = 0,017$). Esses resultados estão representados na Figura 39.

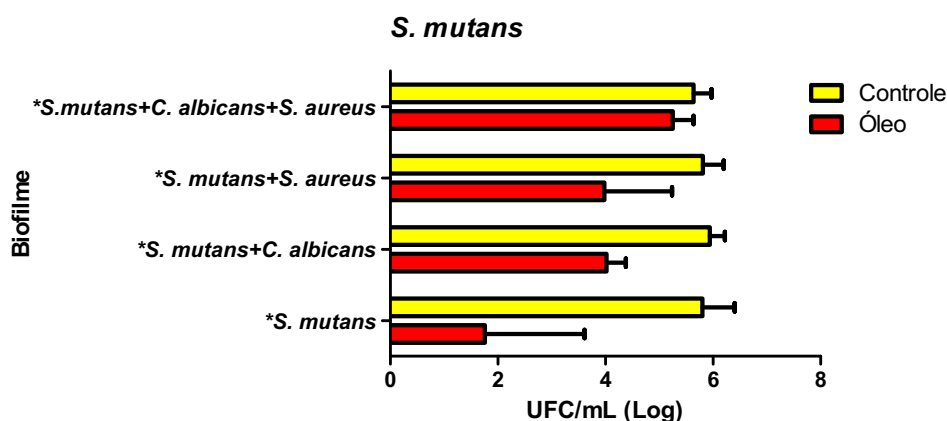


Figura 39 – Médias e Desvio padrão dos dados de UFC/mL (Log) obtidos nos teste de aderência de *S. mutans* isolado ou em associações.

* Diferença estatística ($p \leq 0,05$)

Analisando todos os grupos formados, pode-se observar que *S. mutans* apresentaram menor número de UFC/mL do tratamento em relação aos outros microrganismos (Figura 39).

5.9 Visualização em MEV dos efeitos do óleo essencial de *C. zedoaria* no biofilme

Após a avaliação dos dados em UFC/mL e a análise estatística, foram realizados testes de aderência em corpos-de-prova em resina acrílica para a visualização em microscopia eletrônica de varredura de acordo com os grupos experimentais. Através das análises de MEV foi possível visualizar a aderência nos diferentes grupos experimentais utilizando o tratamento com o óleo essencial de *Curcuma zedoaria* (Figuras 40 a 46).

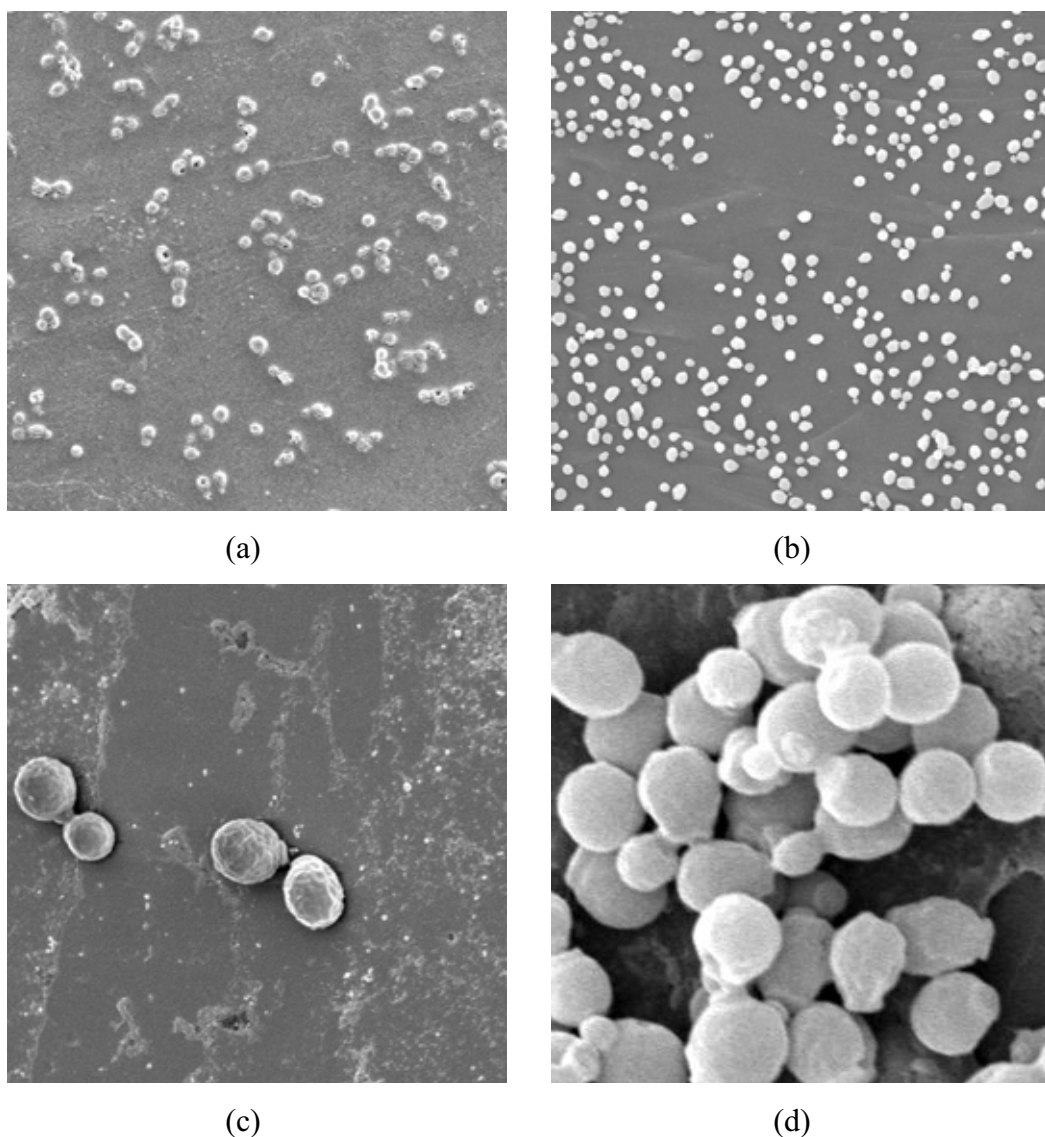


Figura 40 – MEV de biofilmes de *C. albicans* (G1) em corpos-de-prova de resina acrílica após 5 dias de crescimento. (a) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *C. zedoaria* à 3,12% por 5 min, aumento 1000x; (b) MEV do corpo-de-prova do controle aumento 1000x; (c) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com o óleo essencial de *C. zedoaria*, aumento 5000x; (d) MEV do corpo-de-prova do controle, aumento 5000x. Na Figura 40a e 40c se observa redução do número de células fúngicas em relação a Figura 40b e 40d.

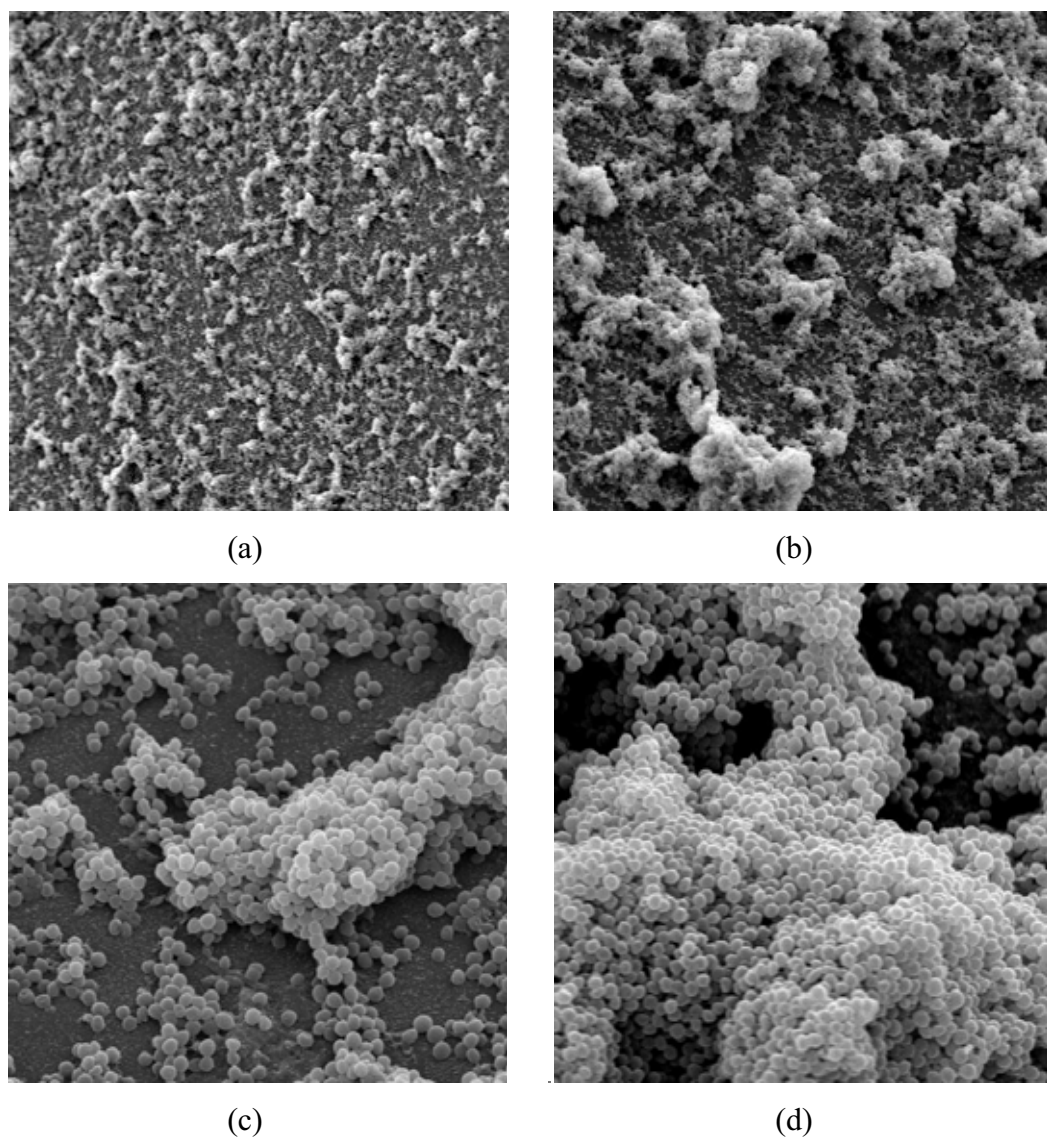


Figura 41 – MEV de biofilmes de *S. aureus* (G2) em corpos-de-prova em resina acrílica após 5 dias de crescimento. (a) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *C. zedoaria* à 6,25% por 5 min, aumento 1000x; (b) MEV do corpo-de-prova do controle aumento 1000x; (c) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com o óleo essencial de *C. zedoaria*, aumento 5000x; (d) MEV do corpo-de-prova do controle, aumento 5000x. Observa-se um aglomerado de células bacterianas na Figura 41d em relação a Figura 41c. De todos os biofilmes formados as cepas de *S. aureus* foram as que apresentaram maior crescimento tanto no biofilme isolado como nas associações.

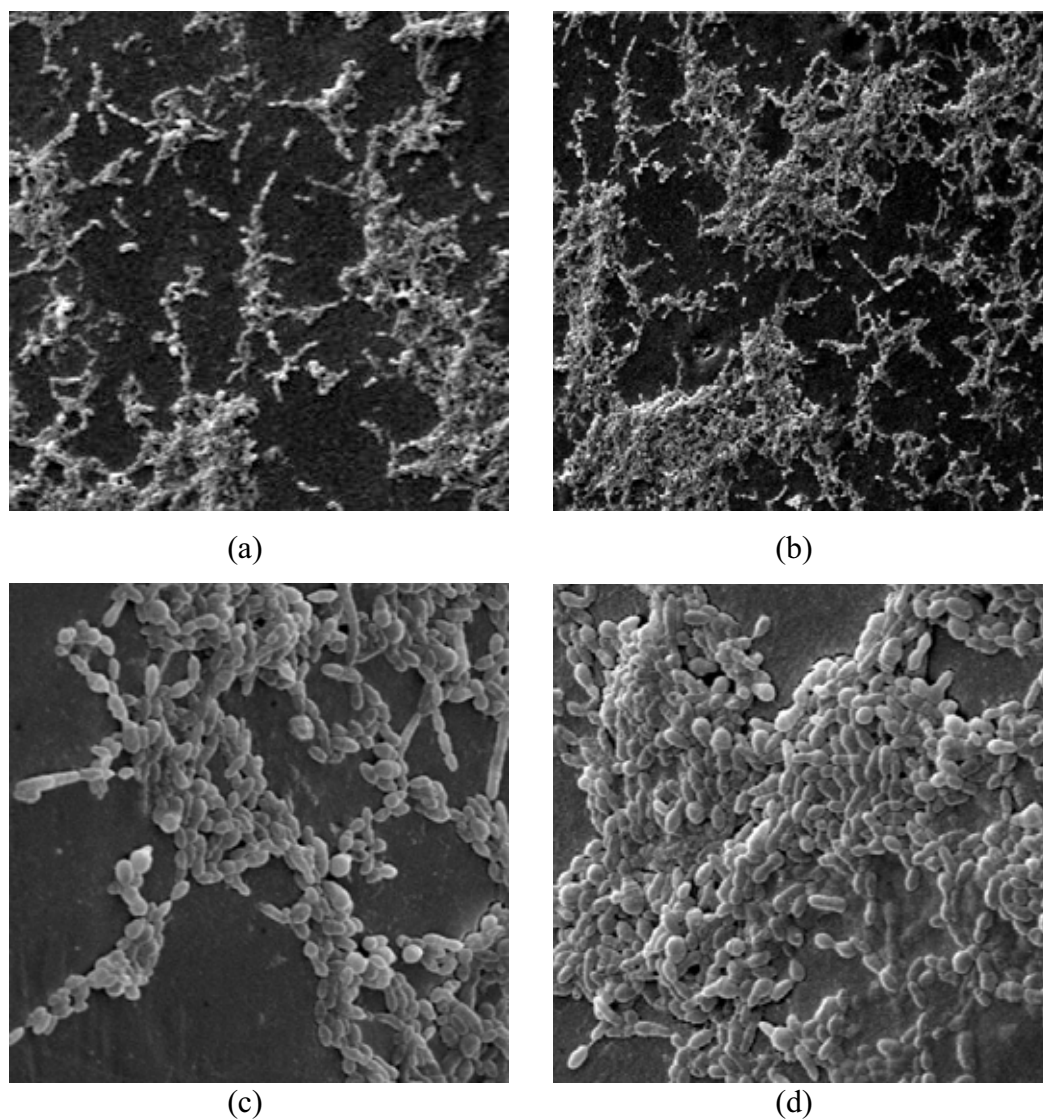


Figura 42 – MEV de biofilmes de *S. mutans* (G3) em corpos-de-prova em resina acrílica após 5 dias de crescimento. (a) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *C. zedoaria* à 3,12% por 5 min, aumento 1000x; (b) MEV do corpo-de-prova do controle aumento 1000x; (c) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com o óleo essencial de *C. zedoaria*, aumento 5000x; (d) MEV do corpo-de-prova do controle, aumento 5000x. Na Figura 42c teve redução no número de células bacterianas em relação a Figura 42d.

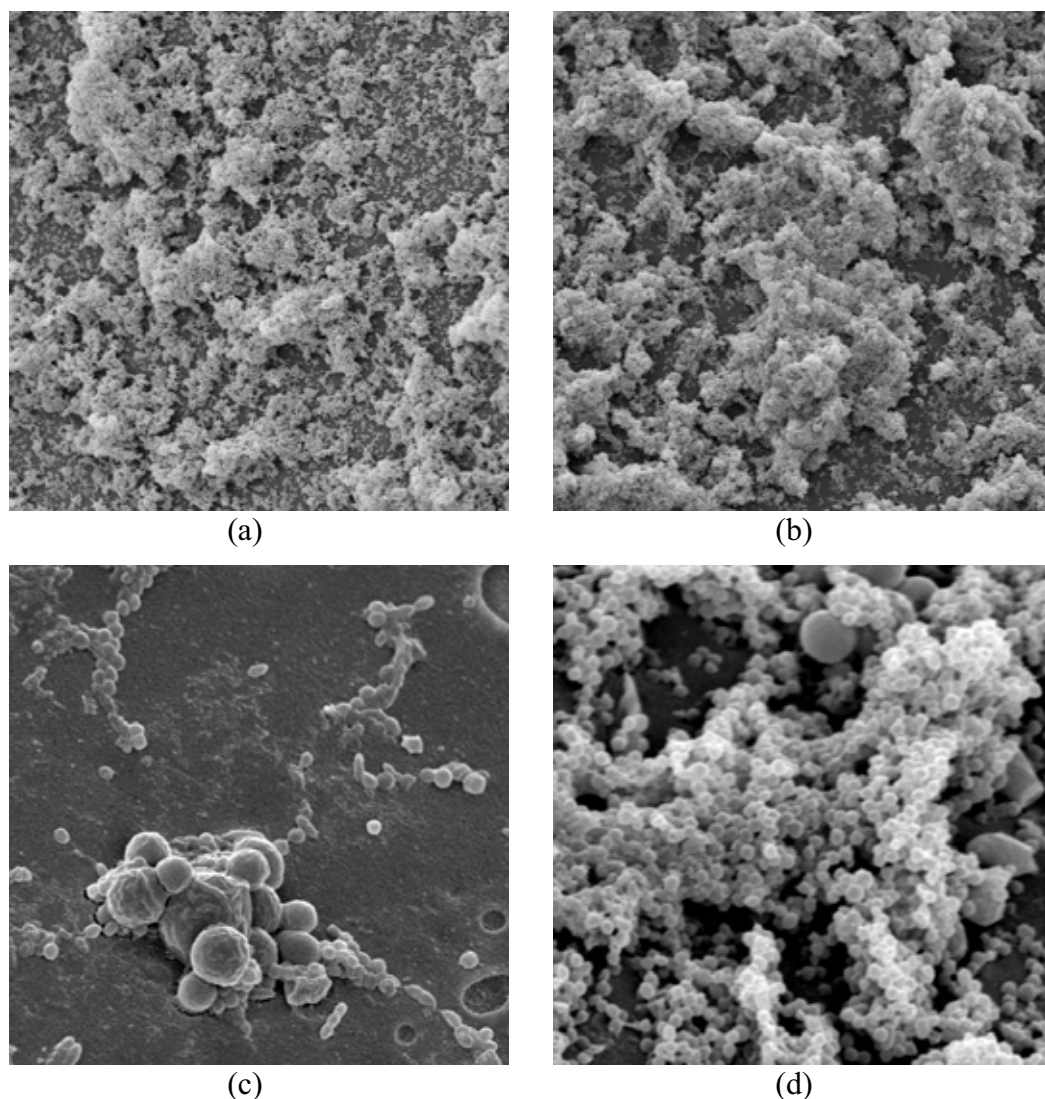


Figura 43 – MEV de biofilmes em associações de *C. albicans* e *S. aureus* (G4) em corpos-de-prova em resina acrílica após 5 dias de crescimento. (a) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *C. zedoaria* à 6,25% por 5 min, aumento 1000x; (b) MEV do corpo-de-prova do controle aumento 1000x; (c) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com o óleo essencial de *T. minuta*, aumento 5000x; (d) MEV do corpo-de-prova do controle, aumento 5000x. Observa-se uma concentração de células microbianas (Figura 43d), enquanto que na Figura 43c houve redução no número de células fúngicas.

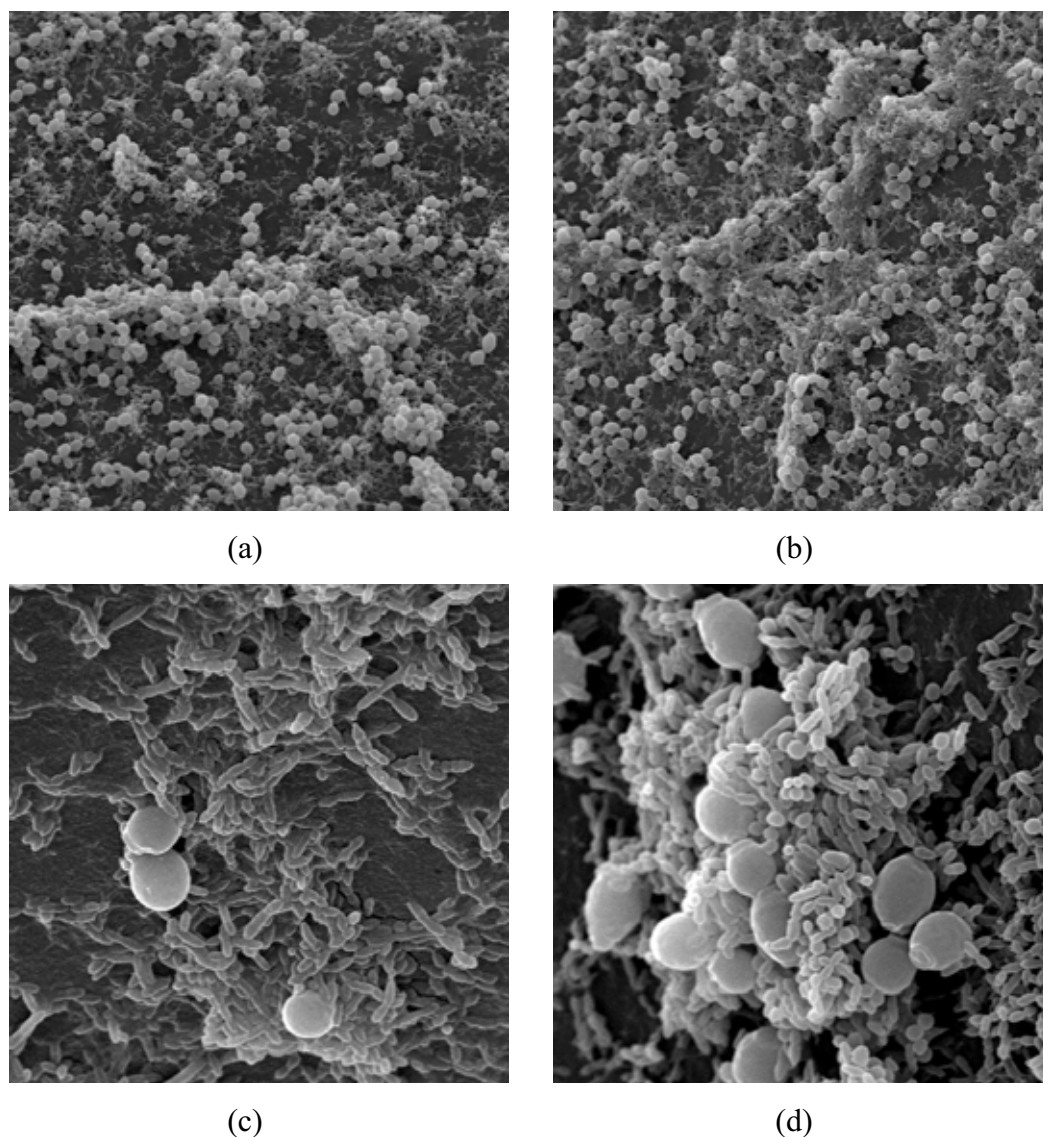


Figura 44 – MEV de biofilmes em associações de *C. albicans* e *S. mutans* (G5) de corpos-de-prova em resina acrílica após 5 dias de crescimento. (a) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *C. zedoaria* à 3,12% por 5 min, aumento 1000x; (b) MEV do corpo-de-prova do controle aumento 1000x; (c) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com o óleo essencial de *C. zedoaria*, aumento 5000x; (d) MEV do corpo-de-prova do controle, aumento 5000x. Observa-se uma redução no número de *C. albicans* (Figura 44c).

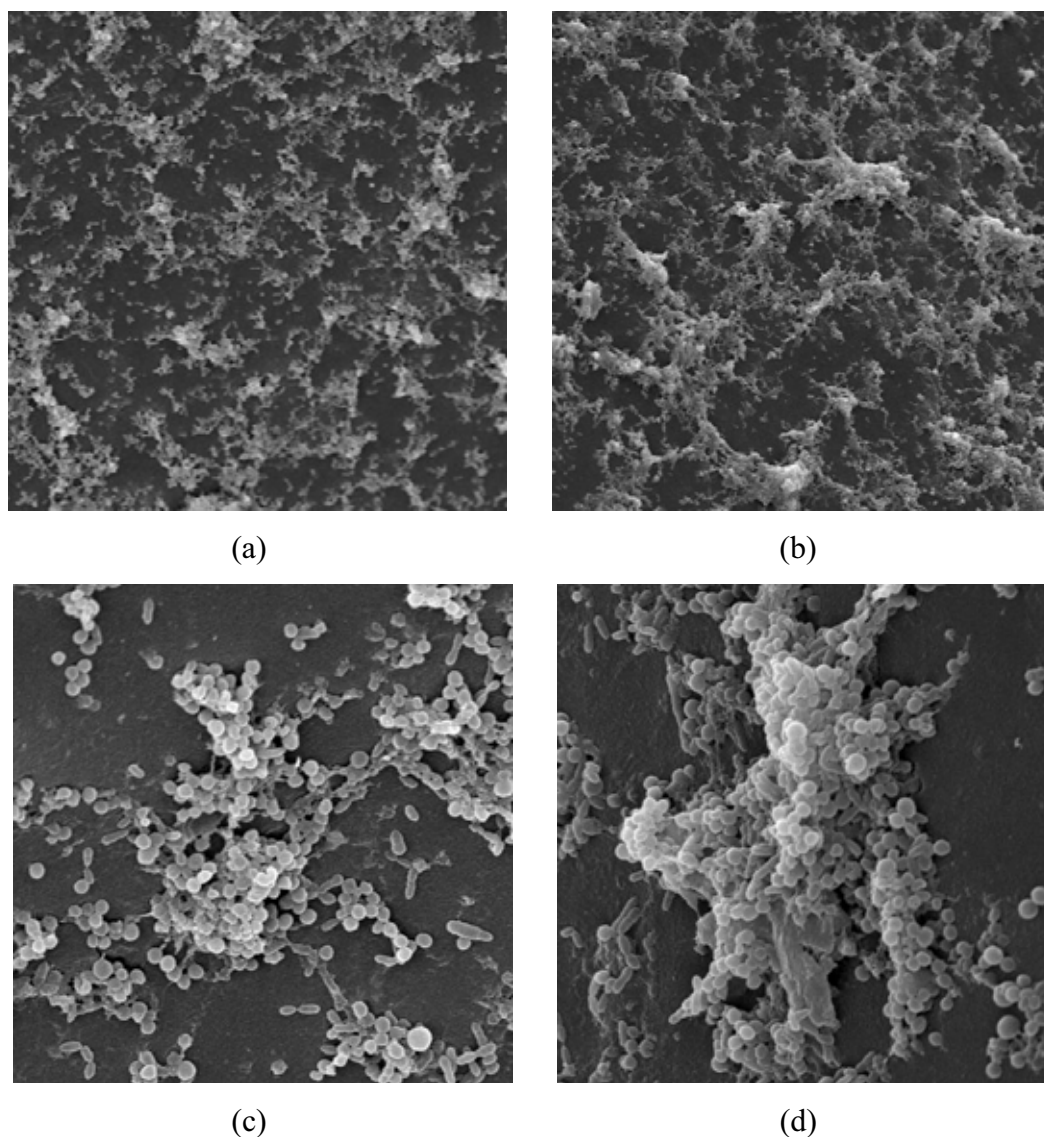


Figura 45 – MEV de biofilmes em associações de *S. mutans* e *S. aureus* (G6) em corpos-de-prova de resina acrílica após 5 dias de crescimento. (a) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *C. zedoaria* à 3,12% por 5 min, aumento 1000x; (b) MEV do corpo-de-prova do controle aumento 1000x; (c) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com o óleo essencial de *C. zedoaria*, aumento 5000x; (d) MEV do corpo-de-prova do controle, aumento 5000x. Observa-se uma menor aglomeração de células na Figura 45c com relação a Figura 45d, entretanto não houve diferença estatística no grupo *S. mutans* e *S. aureus*.

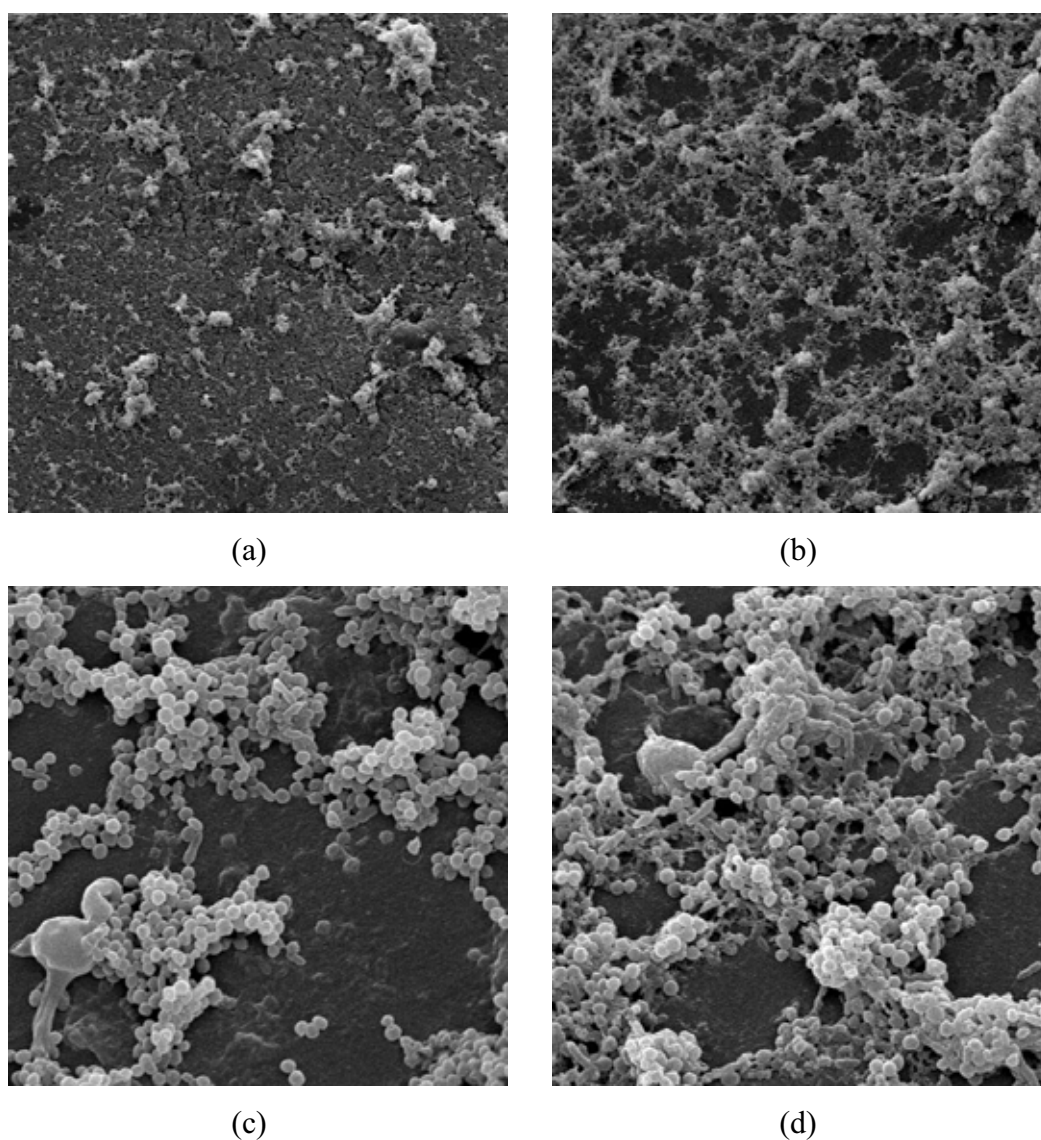


Figura 46 – MEV de biofilmes em associações de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* (G7) em corpos-de-prova em resina acrílica após 5 dias de crescimento. (a) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com óleo essencial de *C. zedoaria* à 3,12% por 5 min, aumento 1000x; (b) MEV do corpo-de-prova do controle aumento 1000x; (c) MEV do corpo-de-prova com biofilme após tratamento com o óleo essencial de *C. zedoaria*, aumento 5000x; (d) MEV do corpo-de-prova do controle, aumento 5000x. Observa-se a presença de polissacarídeos extracelulares (Figura 46a).

6 DISCUSSÃO

Plantas medicinais têm sido utilizadas em vários países como tratamento alternativo no combate de diversas doenças, tanto na forma de extratos brutos, purificados, ou componentes bioativos isolados (Duarte et al., 2005). Muitos extratos de plantas e óleos essenciais isolados de plantas medicinais têm demonstrado exercer atividade biológica “*in vitro*” e “*in vivo*” (Kalemba; Kunicka, 2003; Kim, 2005; Bakkali et al., 2007; Palombo, 2009).

Pesquisas com extratos ou óleos essenciais provenientes de espécies vegetais estão sendo realizadas com o objetivo de buscar uma aplicação racional dos princípios ativos desses vegetais no tratamento de infecções causadas por fungos, bactérias, parasitas ou vírus (Kunicka, 2003; Alves et al., 2000; Gurib-Fakim, 2006). Atualmente, muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas utilizando-se de microrganismos patogênicos e resistentes aos antimicrobianos (Nascimento et al., 2000; Sartoratto et al., 2004). Diversos estudos realizados, assim como os resultados do presente estudo, revelaram potencial das plantas para tratamento terapêutico (Manohar et al., 2001; Rojas et al., 2003; Fisher; Phillips, 2008; Khan et al., 2008). Os óleos essenciais, coletados de diferentes plantas, e, utilizados no presente trabalho apresentaram capacidade microbicida para os microrganismos na forma planctônica, mesmo quando empregados em baixas concentrações. No presente estudo, os óleos essenciais das espécies *Cymbopogon citratus*, *Curcuma zedoaria* e *Tagetes minuta* foram também testados em biofilmes, onde é sabido que os microrganismos são mais resistentes aos antimicrobianos quando comparado com a forma

planctônica. A principal observação é que os óleos essenciais apresentaram efeitos antimicrobianos quando aplicados sobre biofilmes.

O aumento da resistência aos antimicrobianos convencionais adquiridas pelos microrganismos é crescente e as perspectivas futuras da produção e uso de novos antimicrobianos ainda continua incerta. Desta forma, o uso das substâncias extraídas dos vegetais de conhecida atividade antimicrobiana podem ser significativos nos tratamentos terapêuticos (Loguercio et al., 2005). Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram sugerir que as substâncias naturais presentes em *Cymbopogon citratus*, *Curcuma zedoaria* e *Tagetes minuta* podem constituir perspectiva para a obtenção de antibióticos naturais. Novos estudos avaliando a caracterização química, farmacológica e toxicológica dessas substâncias devem ser realizados, visando garantir o uso racional das plantas medicinais e aromáticas avaliadas.

Para a extração dos princípios ativos de *Cymbopogon citratus* são utilizados diferentes métodos de preparo de suas folhas. Entre eles podemos citar: extrato hidroalcoólico, extrato glicólico e óleo essencial (Onawunmi, 1989; Schuck et al., 2001; Sartoratto et al., 2004; Duarte et al., 2005). Em nosso estudo não foram testados os componentes do óleo essencial separadamente, entretanto, o óleo essencial de *C. citratus* apresenta três componentes principais em sua composição: alfa citral (geranial), beta citral (neral) e myrceno. Alfa citral e beta citral apresentam atividade antimicrobiana sobre microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos.

Nos resultados do presente estudo, o óleo essencial de *C. citratus* demonstrou maior ação frente às cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, sendo efetivo na inibição e eliminação desses microrganismos. Observou-se também que o mesmo óleo foi eficaz contra bactérias *S. epidermidis*, *S. aureus* e *S. mutans*. Almeida et al. (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *C.*

*citratu*s por meio do método da microdiluição em caldo sobre *Candida* spp. e os resultados demonstraram que o extrato foi efetivo na concentração de 62,5 mg/mL para 96,6% das cepas de *C. albicans* e na concentração de 125 mg/mL para 50% das cepas *C. tropicalis*, concordando com os resultados do presente estudo.

Também, foram encontrados efeitos antimicrobianos utilizando óleo essencial de *C. citratu*s, por Onawunmi (1989), que analisaram a ação deste óleo a 0,05% sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*, pelo método de difusão em agar. O autor observou halos de inibição de 15 mm para *E. coli*, e 32 mm para *B. subtilis* e *S. aureus*, concluindo que o óleo essencial de *C. citratu*s apresentou uma boa atividade antimicrobiana mesmo em baixas concentrações.

Schuck et al. (2001), encontraram atividade antifúngica do óleo essencial de *C. citratu*s sobre cepas de *Candida albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, utilizando o método de difusão radial em agar. Os autores avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato aquoso e óleo essencial de *C. citratu*s em cepas padrão (ATCC) de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* e os resultados revelaram que o infuso das folhas frescas e a porção citral do óleo demonstraram atividade para *S. aureus*, exibindo diâmetro de halos de inibição de 22 a 26 mm respectivamente. O método de difusão radial em agar, que consiste em verificar, após semeadura de microrganismos e incubação por determinados períodos de tempo, a formação de halos de inibição ao redor do produto utilizado. No método de difusão, o material geralmente é colocado em escavações realizadas após solidificação do agar ou embebido em discos de celulose. Algumas considerações sobre este método necessitam ser ressaltadas: Primeiramente, deve ser salientado que a formação do halo de inibição está diretamente relacionado com a capacidade da substância em teste, se difundir no agar. Este fator está na dependência do tamanho da molécula Além disso, outros fatores podem interferir no resultado do

produto testado: a) necessidade de íntimo contato do material com as paredes da escavação ou disco; b) peso molecular e carga do produto; c) concentração da substância testada; d) viscosidade do gel (agar); e) concentração iônica do meio. Outro fator importante é o tempo de avaliação da formação do halo de inibição. Deve-se ressaltar que neste método, a análise diz respeito mais à qualidade e não quantidade, visto que o tamanho do halo não é sinônimo de que um material é mais efetivo que o outro (Shalhav et al., 1997; Mickel et al., 2002; Cos et al., 2006; Bonev et al., 2008).

Hammer et al. (1999), avaliaram a ação do óleo essencial de *C. citratus* utilizando o método de diluição em agar, sobre os microrganismos: *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veronii*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens* e *Staphylococcus aureus*. Foi encontrada importante ação antimicrobiana do óleo de *C. citratus* para todos os microrganismos analisados. A CIM do óleo essencial de *C. citratus* foi de 0,06% para *S. aureus* e *C. albicans*. Nos resultados obtidos no presente trabalho, a CIM para *Candida albicans* foi 0,031% e para *S. aureus* 0,125%. Segundo os autores, a comparação dos dados obtidos nos diferentes trabalhos é dificultada, pois a composição do óleo essencial da planta pode variar de acordo com: as condições locais e climáticas do ambiente. A técnica de extração e da utilização do óleo e a escolha dos microrganismos testes também são importantes. No método de diluição em agar, o material é diluído no meio de cultura e a seguir o microrganismo é semeado no meio, para se determinar a concentração inibitória mínima (CIM). Contudo, durante o procedimento de diluição, reações entre componentes e as substância testada, ou precipitação com o ágar podem ocorrer, prejudicando a avaliação da atividade antimicrobiana (Fuss et al., 1997; Cos et al., 2006).

O óleo essencial de *Tagetes minuta* L., fitoterápico empregado na presente pesquisa, apresentou bons resultados nas cepas

utilizadas, embora tenha sido efetivo em concentração superior da obtida com óleo essencial de *C. citratus*. A ação de *T. minuta* foi melhor nas cepas fúngicas, seguidas pelas cepas bacterianas. A ação antimicrobiana de *T. minuta* foi demonstrada por Souza et al. 2000, que utilizaram diluições seriadas do decocto de *T. minuta* frente a diferentes bactérias e revelaram que o mesmo na concentração de 100% apresentou ação bactericida sob *S. aureus*, *E. coli* e *E. faecalis*. A comparação dos resultados de Souza et al., 2000, com os do presente trabalho devem ser observadas com cuidado, pois a metodologia e o produto de *T. minuta* utilizados foram diferentes.

O óleo essencial de *Curcuma zedoaria*, também empregado neste trabalho, apresentou atividade antimicrobiana nas cepas analisadas embora em concentrações superiores ao da encontrada em *C. citratus* e *T. minuta*. O óleo de *C. zedoaria* exibiu uma característica interessante, pois apresentou uma forte turbidez nas primeiras diluições após 24 h, dificultando a leitura dos resultados. Assim para confirmação, todos os testes foram confirmados pela semeadura em meios de cultura, comprovando o efeito microbicida.

Foi verificado que a espécie mais sensível foi *C. albicans*, pois o óleo de *C. zedoaria* na concentração de 3,12% produziu efeito fungicida em 70% das cepas de *C. albicans*. Em concentração superior, o óleo essencial de *C. zedoaria* a 12,5%, apresentou efeito microbicida em 50% das cepas de *S. aureus* e 40% de *S. mutans*. Para as outras cepas, fungicas e bacterianas, a concentração microbicida do óleo foi de 25%. Por outro lado, extrato etanólico de *Curcuma zedoaria* não demonstrou efetividade para *S. aureus* na concentração de 3,75 mg/mL no trabalho de Wilson et al., 2005. Os autores utilizaram, entretanto, método de difusão em agar.

Bugno et al. (2007) verificaram a atividade antimicrobiana do extrato de *Curcuma zedoaria* frente a *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Os

autores compararam com a atividade antimicrobiana, em crescimento planctônico, de cinco anti-sépticos (cloreto de cetilpiridínio, tinturas de camomila e mirra, óleos de *Melaleuca salvia* e eucalipto, timol, eucaliptol salicilato de mentol, e triclosan e gluconato de clorexidina) pelo método de pour-plate. Foram adicionados 9 mL do produto em um tubo, o qual foi deixado em banho-maria a 22°C por aproximadamente 20 minutos. Uma suspensão de cultura contendo 10^8 UFC/mL foi preparada e 10 mL foi adicionado na solução teste. Trinta, sessenta e noventa segundos após a adição da suspensão, uma alíquota de 1,0 mL desta mistura foi transferida para 9,0 mL de caldo Lethen, usado para neutralizar a atividade antimicrobiana residual do produto. O número de microrganismos viáveis no caldo foi determinado pelo método de pour-plate, em agar TSB e as placas foram incubadas por 48 horas por 36°C e aquelas contendo *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecalis* em condições de microaerofilia (10% de CO₂). Os resultados demonstraram que a eficácia antimicrobiana do extrato de *Curcuma zedoaria* Roscoe foi similar ao dos produtos comerciais, havendo uma redução UFC/mL. No presente trabalho na determinação da atividade antimicrobiana foi utilizado o método de microdiluição seriada em caldo Sabouraud ou BHI em placas de microtitulação e a CMM através da semeadura em placas com agar específico para cada microrganismo testado. Após o período de incubação três alíquotas desta mistura do teste anterior que não apresentaram crescimento em caldo foram semeadas em placas de agar Sabouraud ou BHI e incubadas por 48 h a 37°C e para *S. mutans* 48 h a 37°C em estufa de CO₂ (5%). Os resultados demonstraram que óleo essencial de *C. zedoaria* apresentou atividade microbiostática e microbicide em todas as cepas analisadas.

É importante salientar que quando se realiza a comparação dos resultados do presente estudo com os da literatura, deve-se levar em consideração a variação natural da composição dos óleos essenciais, mesmo entre espécies iguais, em decorrência de

colheitas em épocas diferentes, variações climáticas e métodos de extração utilizados. Além disso, as diferentes metodologias realizadas para testes microbiológicos e diferentes cepas de microrganismos utilizados também podem interferir nos resultados (Tampieri et al., 2005).

A atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*, *Curcuma zedoaria* e *Tagetes minuta*, tanto na forma de extrato como no de óleo essencial, foram testados em vários patógenos. Entretanto, nenhum estudo para avaliar seu efeito sobre os microrganismos organizados em biofilmes foi encontrado na literatura. Na ausência de trabalhos similares para comparação, os resultados do presente trabalho, investigando a atividade antimicrobiana sobre biofilmes, foram discutidos com outras referências, as quais utilizaram metodologias diferentes.

Nostro et al. (2007) avaliaram os efeitos do óleo essencial do orégano e as frações carvacrol e timol sobre biofilmes de *S. aureus* e *S. epidermidis* pré-formados e em formação. Os biofilmes foram formados em placas de microtitulação de polietileno de fundo chato. Após 24h de incubação a 37°C a fase planctônica das células foram delicadamente removidas e as células fixadas no fundo da placa foram lavadas três vezes com PBS e acrescentados 200 µL de duas diluições do óleo nas placas e incubadas a 37°C por 24h a D.O. foi mensurada como a mais baixa concentração, onde não ocorreu crescimento, confirmado pela D.O. comparada com a leitura inicial. As amostras do biofilme no fundo da placa foram agitadas e espalhados sobre placas de agar contendo TSB (Tryptic Soy agar) e incubadas por 72h a 37°C a concentração da erradicação do biofilme foi determinado com a mais baixa concentração onde não ocorreu crescimento bacteriano sobre o agar TSA. Na avaliação dos efeitos do óleo essencial do orégano e suas frações sobre o biofilme em formação, foram realizados testes utilizando placas de microtitulação de polietileno de fundo chato. Os microrganismos foram incubados durante a noite em 10mL de TSB com 1% de glicose, após incubação o meio de crescimento foi diluído 5×10^{-5} UFC/mL e distribuídos 100 µL em

cada um dos 96 poços da placa de microtitulação juntamente com 100 µL da concentração subinibitória do óleo essencial do orégano e suas frações carvacrol e timol (0,5, 0,25 e 0,125 %). Após incubação por 24 h a 37°C cada poço da placa foi lavado gentilmente duas vezes com solução PBS (pH = 7,4) estéril e foram tingidos com safranina 0,1% por 1 min. e lavados com água. Após esta etapa, os biofilmes foram ressuspensos em 200 µL de PBS e aferidos em aparelho de espectrofotometria usando leitor ELISA. Os resultados revelaram que o óleo essencial de *Oreganum vulgare*, as frações carvacrol e timol sobre os biofilmes in vitro foram ligeiramente mais altos do que nas culturas planctônicas. Para a maioria das cepas testadas a concentração inibitória do biofilme variou de 0,125 a 0,500% para o óleo essencial do orégano e 0,031 a 0,125% para o carvacrol e timol e a concentração bactericida mínima do biofilme o óleo essencial variou de 0,125 a 1,0% enquanto que as frações carvacrol e timol foram de 0,125 a 0,500%.

Ebrahimi et al. (2008) também avaliaram a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Thymus caramanicus* (tomilho) pelo método de difusão em disco usando meio Mueller-Hinton com determinação de zonas de inibição. Foram utilizadas cepas ATCCs de três bactérias Gram-negativas e quatro bactérias Gram-positivas: *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*. O MIC, foi medido por ensaio microdiluição de susceptibilidade em caldo. O óleo essencial puro e a solução de 70% de Carvacrol em metanol foi aplicada sobre os discos de papel (o diâmetro do disco foi de 6 mm). Os discos de papel foram então colocados nas placas. Após 24 h de incubação a 37°C o diâmetro do crescimento e as zonas de inibição foram medidos. Os resultados revelaram que a CIM e os halos de inibição exibiram forte atividade antimicrobiana para o óleo essencial puro de *T. caramanicus*. Nas cepas sensíveis houve variação

de 0,45-14,4 mg/ml e 14-37 mm e da fração carvacrol nas mesmas cepas foi de 11-40 mm e valor de CIM de 0,22-14,4 mg/ml.

Alviano et al. (2005) comprovaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Croton cajucara* (sacaca) e sua fração o linalol em biofilmes artificiais e microrganismos planctônicos. Os microrganismos utilizados no trabalho foram cepas padrão de *Lactobacillus casei*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans* e microrganismos relacionados com a doença periodontal *Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus aureus* e *C. albicans*. Os autores realizaram a CIM com diferentes concentrações (1 pg/ml e 1 mg/ml) do óleo essencial ou a fração linalol, diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) numa concentração final de 1% nos meios de cultura. Foram utilizadas 10^6 células/ml. Após 48h de cultivo a 37°C, a concentração mínima inibitória (MIC) para cada condição foi determinada visualmente. Para a formação do biofilme os microrganismos foram obtidos a partir de um pool de saliva não estimulada de cinco indivíduos com aparelho ortodôntico fixo. Foram utilizadas 20 µL de saliva espalhada sobre discos de membrana de celulose (13 mm de diametro e 0,22 µL de diametro dos poros). Os discos de membrana de celulose foram colocados em placas contendo BHI sólido e incubados anaerobiamente por 72 horas a 37°C. Após o crescimento dos microrganismos os discos foram recolhidos, colocados em um tubo de vidro com 1 ml de óleo essencial e a solução de linalol (100 µL/ml) e mantidos por 3 min. Para retirar as células microbianas não aderidas, foram então mantidas em solução de salina estéril por 27 min e lavadas duas vezes. Após este procedimento, a matriz de celulose foi submetida a agitação em aparelho vortex por 20 s. As células extraídas foram semeadas em meios sólidos específico para cada microrganismo, incubados anaerobiamente por 72 h e a análise da viabilidade celular por contagem do número de colônias (UFC). O mesmo procedimento foi realizado com microrganismos ATTC (10^4 células/mL). Os resultados mostraram que o óleo essencial de *C. cajucara* apresentou valores de

MIC variando de 13,34 a 40,1 µg/mL, enquanto que a fração linalol não apresentou efeitos bactericida. No biofilme, o óleo essencial apresentou redução no número de células microbianas quando comparadas com o controle (clorexidina) e a fração linalol do óleo.

Os biofilmes representam o tipo de crescimento microbiano predominante na natureza e são de grande importância no desenvolvimento de infecções, uma vez que podem servir de nicho para agentes patogênicos. Além disso, os microrganismos quando organizados em biofilme são mais resistentes aos antimicrobianos (Chandra et al., 2001). Segundo Kirkpatrick et al. (2000), o biofilme possui uma série de vantagens para o microrganismo, possibilitando comunicação entre as células, facilitando nas atividades bioquímicas, favorecendo a proliferação dos microrganismos e atuando na defesa coletiva contra a ação de agentes antimicrobianos.

Para estabelecer qual seria a diluição dos óleos essenciais a serem utilizados nos biofilmes, foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas e microbicidas de cepas clínicas e padrão para cada microrganismo. Foram utilizadas nove cepas clínicas de cada microrganismo e 1 ATCC para confirmar que em determinada concentração do óleo essencial a maioria dos microrganismos foram inibidos ou exterminados. Para a determinação da CIM e CMM identificou-se diferenças mínimas de uma a duas diluições dos óleos entre uma cepa e outra. Entretanto quando comparamos as cepas clínicas e ATCC todas apresentaram a CIM e a CMM pelo menos uma ou duas diluições posterior do que a maioria das cepas clínicas.

No presente estudo, a aplicação do óleo essencial de *C. citratus*, *Tagetes minuta* e *Curcuma zedoaria* por 5 min no biofilme pré-formado, apresentou atividade antimicrobiana sobre todos os microrganismos estudados, tanto em biofilmes simples como mistos, exceto para alguns grupos em associações quando comparados com o controle.

Uma das possíveis razões do aumento da resistência aos antimicrobianos das células do biofilme é a dificuldade do antimicrobiano penetrar na matriz, a qual funciona como uma barreira, envolvendo os microrganismos. A alteração do microambiente também contribui para o lento crescimento microbiano, favorecendo a aquisição de fenótipos de resistência das células persistentes (Al-Fattani; Douglas, 2004; Fux et al., 2005; Gilbert et al., 2007).

Observou-se que após o tratamento com *C. citratus*, no biofilme misto de *C. albicans* e *S. aureus*, houve uma redução do número UFC/mL (Log) de *C. albicans* e *S. aureus* em relação aos biofilmes simples e biofilmes com as associações.

Na contagem de UFC/mL (Log) do biofilme de *S. mutans* tratado com o óleo de *C. citratus*, quando organizado em biofilme misto com *S. aureus* e *Candida albicans*, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado com óleo de *C. citratus* e o grupo controle. Segundo Dunne (2003), o efeito de um antimicrobiano no biofilme ocorre somente sobre os microrganismos posicionados na camada mais externa do mesmo, permanecendo vivos os que estão presentes nas camadas mais internas, sendo protegidos pelas camadas de polissacarídeos extracelulares produzidas pelas cepas. Esses dados sugerem que na formação do biofilme composto por *S. mutans*, *S. aureus* e *Candida albicans*, o microrganismo *S. mutans* pode ter ocupado a posição mais interna do biofilme e por isso se tornou mais resistente ao óleo essencial de *C. citratus*. Segundo Baena-Monroy et al. (2005) a resistência antimicrobiana pode estar relacionada a incapacidade de penetração do medicamento no biofilme, devido a diferença do ritmo de crescimento celular dos microrganismos que compõe a comunidade microbiana ou um mecanismo específico para a expressão de genes de resistência antimicrobiana.

O óleo essencial de *C. citratus* produziu redução nas contagens de UFC/mL dos microrganismos organizados em biofilmes com

apenas uma espécie de *S. aureus*, *S. mutans* ou *C. albicans*. Entretanto esta redução foi menor quando comparada com os biofilmes mistos. Esse fato pode ser visualizado no presente trabalho, nas fotomicrografias obtidas por meio de MEV, as quais demonstraram que os microrganismos em biofilmes isolados apresentaram maior sensibilidade aos antimicrobianos do que em biofilmes mistos. No tratamento do óleo essencial de *T. minuta* a 4% quando houve a associação de *S. aureus* e *C. albicans* este não foi efetivo para *S. aureus* que apresentou redução menor que 1%.

Nas associações dos microrganismos realizadas no presente estudo, a análise visual dos biofilmes demonstrou aumento da espessura dos biofilmes formados quando *C. albicans* e *S. mutans* foram inoculados juntos. Barbieri et al. (2007), ao analisarem a aderência de *C. albicans* e *S. mutans*, *in vitro*, na superfície dentária verificaram que a mesma foi mais extensa quando esta bactéria foi cultivada com *C. albicans*. Esse dado parece indicar uma característica de protocooperação entre *C. albicans* e *S. mutans* em biofilmes.

Nos biofilmes formados pela associação de *S. aureus* e *S. mutans* e *C. albicans*, tratados com o óleo essencial de *C. zedoaria* não houve diferença estatística para *S. aureus*, embora tenha ocorrido redução significativa quando este microrganismo se encontrava em biofilme isolado. Segundo Marsh (1992) diferenças observadas *in vivo* e *in vitro* da ação do agente antimicrobiano podem estar relacionadas com suas características de penetração no biofilme, podendo atuar como biostático ou biocida sobre os microrganismos. Segundo Baena-Monroy et al. (2005), biofilmes mistos apresentam diferentes padrões de sensibilidade quando em contato com antimicrobianos.

Na análise dos resultados da CIM observou-se que as leveduras foram as cepas que apresentaram maior sensibilidade frente a aplicação dos óleos essenciais. Por esse motivo foram aplicados nos biofilmes duas concentrações diferentes dos óleos essenciais. A menor

concentração foi utilizada quando o biofilme isolado ou misto era composto por *C. albicans*. A maior concentração dos óleos foi utilizada para a bactérias, conforme verificado na CMM. É importante observar que em alguns casos, para a aplicação do óleo no biofilme, não houve diferenças estatísticas em determinados grupos. Por outro lado, se fossem aplicados nos biofilmes uma concentração superior ou pura dos óleos essenciais poderia ocorrer o efeito microbicida. No entanto, esse não foi o propósito do trabalho e sim, o de verificar se os óleos essenciais apresentariam efeito microbiostático nos biofilmes.

Neste contexto, a pesquisa de novos agentes que possam inibir o crescimento do biofilme multi-espécies são necessários, podendo ser utilizados em novas alternativas terapêuticas.

7 CONCLUSÃO

A partir da metodologia empregada, os resultados permitiram concluir que os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, *Tagetes minuta* L. e *Curcuma zedoaria* Roscoe apresentaram:

- a) atividade bacteriostática, fungistática e microbicida sobre todas as cepas de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* e *Candida* spp. na forma planctônica;
- b) as cepas mais sensíveis em relação a concentração microbicida mínima do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* foram *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* seguidas pelas cepas de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*;
- c) as cepas mais sensíveis em relação concentração microbicida mínima do óleo essencial de *Tagetes minuta* foram às *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*; seguidas então pelas cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus mutans*;

d) as cepas mais sensíveis em relação concentração microbicida mínima do óleo essencial de óleo de *Curcuma zedoaria* foi *Candida albicans* e a mais resistente foi *Streptococcus mutans*;

e) atividade microbiostática sobre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* quando organizados em biofilmes simples e mistos havendo reduções significativas das UFC/mL dos microrganismos.

8 REFERÊNCIAS*

Aas J, Paster BJ., Stokes LN., Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. J Clin Microbiol. 2005; 43(11):5721-32.

Albuquerque UP, Medeiros P M, Almeida ALS, Monteiro JM, Lins Neto EM de Freitas, Melo JG, Santos JP. Medicinal plants of the caatinga (semi-ari(d) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. J Ethnopharmacol. 2007;114: 325-54.

Ahmad I, Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. J Ethnopharmacol. 2001;74(2):113-23.

Al-Fattani MA, Douglas LJ. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(9):3291-3297.

Almeida RBA, Carretto CFP, Santana RS, Furlan MR, Junqueira JC, Jorge AOC. Atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf sobre *Candida* spp. Rev Odontologia. 2008; 37(2): 147-53.

Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EFA, Júnior AS, Zani CL. Biological screening of brazilian medicinal plants. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000;95(3):367-73.

Alviano WS, Mendonca-Filho RR, Alviano DS, Bizzo HR, Souto-Padrón T, Rodrigues ML, Bolognese AM, Alviano CS, Souza MMG. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. Oral Microbiol Immunol. 2005;20:101-05.

* Baseado em:

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

Baba T, Bae T, Schneewind O, Takeuchi F, Hiramatsu K. Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* strain newman and comparative analysis of *Staphylococcal* genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. J Bacteriol. 2008;190(1):300-10.

Baena-Monroy T, Maldonado VM, Martinez FF, Barrios BA, Quindos G, Vargas LOS. Colonización por *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* em pacientes portadores de prótesis dentales. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2005;10:27-9.

Baillie GS, Douglas LJ. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother. 1998;42(8):1900-5.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - A review. Food Chem Toxicol. 2007;46:446–75.

Balakrishnamet M, Simmonds RS, Kilian M. Different bacteriocin activities of *S. mutans* reflect distinct phylogenetic lineages. J Med Microbiol. 2002; 51(11): 941-8.

Balakrishnan M, Simmonds RS., Tagg JR. Dental caries is a preventable infectious disease. Aust Dent J. 2000;45(4):235-45.

Barbeau J, Séguin J, Goulet, JP, Koninck L, Avon SL, Lalonde B. et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003;95:51-9.

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

Barbosa LCA, Pereira U, Martinazzo AP, Maltha CRA, Teixeira RR, Melo EC. Evaluation of the chemical composition of brazilian commercial *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf samples. Molecules. 2008;13:1864-74.

Blatt, JM, Piazza, CE. Perfil de sensibilidade de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativo isolados em pacientes internados. Rev Bras Anal Clin. 2004;36(2):129-31.

Bonev B, Hooper J, Parisot J. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. J Antimicrob Chemother. 2008; 61:1295–301.

Bugno A, Nicoletti MA, Almodóvar AAB, Pereira T C, Auricchio MT. Antimicrobial efficacy of *Curcuma zedoaria* extract as assessed by linear regression compared with commercial mouthrinses. Braz J Microbiol. 2007;38:440-5.

Burton GRW, Engelkirk PG. Microbiology for the health sciences. 7ª ed. USA. 2004. 418p.

Canetierri ACV, Kretchetoff FY, Fugarra FC, Moreira D, Unterkircher CS. Efeito do anticorpo monoclonal 56G sobre o crescimento de *Streptococcus mutans* em caldo e no acúmulo de placa bacteriana *in vitro*. Cienc Odontol Bras. 2006;9(4):67-75.

Chaffin W L, López-Ribot JL, Casanova, Gozalbo D, Martínez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. Microbiol Mol Biology Reviews. 1998; 62(1):130-80.

Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture and drug resistance. J Bacteriol. 2001; 183(18):5385-94.

Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, Bruyne T, Hermans N, et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. J Ethnopharmacol. 2002;79:213-20.

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; 106:290–302.

Cross LJ, Willians DW, Sweeney CP, Jackson MS; Lewis Mao, Bagg, J. Evaluation of the recurrence of denture stomatitis and *Candida* colonization in a small group of patients who received itraconazole. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;97:351-8.

Devienne KF, Raddi MSG, Pozetti GL. Das plantas medicinais aos fitofármacos. Rev Bras PI Med. 2004;6:11-14.

Duarte MCT, Figuraueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C. Anti-*Candida* activity of brazilian medicinal plants. J Ethnopharmacol. 2005;97:305-11.

Dunne WM. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? Clinical Microbiol Rev. 2003;15(2):155-66.

Ebrahimi SN, Hadian J, Mirjalili MH, Sonboli A, Yousefzadi M. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. Food Chemistry. 2008;110:927–31.

Ellepola ANB; Samaranayake, LP. Adhesion of oral *Candida albicans* isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents. Arch Oral Biol. 1998;43: 999-1007.

Ferreira SH, Barata LES, Salles Filho SLM, Queiroz SRR. Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. An Acad Bras Cienc. Rio de Janeiro, 1998.

Fisher K, Phillips C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? Trends in Food Science & Technology. 2008;19: 156-164.

Fontana M, González-Cabezas C. Secondary caries and restoration replacement: an unresolved problem. Compend Contin Educ Dent. 2000;21:15-27.

Fontana M, Young D, Wolff MS, Pitts NB, Longbottom C. Defining dental caries for 2010 and beyond. Dent Clin North Am. 2010;54(3)423-40.

Forssten SD, Björklund M, Ouwehand AC. *Streptococcus mutans*, caries and simulation models. *Nutrients*. 2010; 2(3), 290-8.

Fuss Z, Weiss EI, Shalhav M. Antibacterial activity of calcium hydroxide containing endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 1997;30(6):397-402.

Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol*. 2005;13:34-40.

Gálvez JLH, Torres IP, Aguilar OEA, Lara ML. Estudio del efecto diurético de la hoja de *Cymbopogon citratus* en modelo de ratas. *Rev Cubana Pl Med*. 1998;3(2):79-82.

Gilbert P, McBain A, Sreenivasan P. Common therapeutic approaches for the control of oral biofilms: microbiological safety and efficacy. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(4):17-24.

Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clin Infect Dis* 2008;1;46(Suppl 5): 350-9.

Götz F. *Staphylococci* in colonization and disease: prospective targets for drugs and vaccines. *Curr Opin Microbiol*. 2004;7:477-87.

Götz, F. *Staphylococcus* and biofilm. *Mol Microbiol*. 2002;43:1367-78.

Gregio AMT, Fortes ESM, Rosa EAR, Simeoni RB, Rosa RT. Ação antimicrobiana do *Zinziber officinale* frente à microbiota bucal. *Estud. Biol*. 2006;28:61-6.

Gurib-Fakim A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med*. 2006;27:1–93.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol*. 1999;86:985–90.

Héthelyi É, Tétényi P, Dabi E, Dános B. The role of mass spectrometry in medicinal plant research. *Biomed Environ Mass Spectrom*. 1987;14:627-632.

Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology*. 2001; 147:1997-2005.

Huebner J, Goldmann DA. Coagulase-negative *Staphylococci*: role as pathogens. *Annu Rev Med*. 1999;50:223-36.

Huyghe A, Francois P, Charbonnier Y, Tangomo-Bento M, Bonetti EJ, Paster BJ, Bolivar I, Baratti-Mayer D, Pittet D, Schrenzel J. Novel microarray design strategy to study complex bacterial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(6):1876-85.

Jabra-Rizk MA, Meiller TF, James E, Shirtliff ME. Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. *Antimicrob Agents Chemoter*. 2006;50(4):1463-69.

Jain PA, Veerabhadru K, Kulkarni RD, Ajantha GS, Shubhada C, Amruthkishan U. Comparative study of adherence of oral *Candida albicans* isolates from HIV sero-positive individuals and HIV sero-negative individuals to human buccal epithelial cells. *Indian J Pathol Microbiol*. 2010; 53(3):519-23.

Jorge AOC. Microbiologia bucal. 3ª ed. São Paulo: Livraria Editora Santos; 2007. 198p.

Jorge AOC. Princípios de Microbiologia e Imunologia. São Paulo: 2006. 418 p.

Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem*. 2003;10:813–29.

Kato ETM, Fischer D.C. Comparative pharmacognosy on the rhizome and root of *C. zedoaria* (Bergius) Roscoe: crude drug, essential oil and fluid extract. *LECTA*, 1996;14(2):9-26.

Khan R, Islam B, Akram M, Shakil S, Ahmad A, Ali SM, Siddiqui M, Khan AU. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules*. 2008;13:1-12.

Kim HS. Do not put too much value on conventional medicines. *J Ethnopharmacol*. 2005;100:37–9.

Kirkpatrick WR, López-Ribot JL, Mcatee RK, Patterson TF. Growth competition between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* under broth and biofilm growing conditions. *J Clin Microbiol*. 2000;38(2):902-4.

Kissmann, KG.; Groth, D. Plantas infestantes e nocivas. Ludwigshaven : Basf, 1992. v.2, p.355-6.

Kochima FAT, Ming, LC, Marques, MOM. Produção de biomassa, rendimento de óleo essencial e de citral em capim-limão, *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, com cobertura morta nas estações do ano. *Rev Bras PI Med*. 2006; 8(4):112-6.

Komiyama EY, Ribeiro PM, Junqueira JC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Prevalence of yeasts in the oral cavity of children treated with inhaled corticosteroids. *Braz Oral Res*. 2004;18(3):197-201

Kreth J, Hagemrman E, Tam K, Merrit J, Wong DT, WU BM, Myung NV, Shi W, QI F. Quantitative analyses of *Streptococcus mutans* biofilms with quartz crystal microbalance, microjet impingement and confocal microscopy. *Biofilms*. 2004;1(4):277-84.

Kuramitsu HK, He X, Lux R, Anderson AH, Shi LH. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007;71(4) 653-70.

Lai EY, Chyau CC, Mau JL, Chen CC, Lai YJ, Shih CF, Lin LL. Antimicrobial activity and cytotoxicity of the essential oil of *Curcuma zedoaria*. *Am J Chin Med*. 2004;32(2)281–90.

Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J. Formation of *Candida albicans* biofilms on non-shedding oral surfaces. J Oral Sci. 2003;11: 465-71.

Lengeler KB, Davidson RC, D'Sousa C, Harashima T, Shen W, Wang P, Pan X, et al. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. Microbiol Mol Biol Rev. 2000;64(4):746-85.

Lewinsohn E, Dudai N, Tadmor Y, Katzir I, Ravid U, Putievky E, Joel DM. Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf. Ann Bot.1998;81:35-9.

Liberalli CH, Helou JH, França Ada A. Contribuição ao estudo das gramíneas aromáticas. Rev. Bras Farmácia, Artigos originais. 1946; 189-209.

Lima IO, Oliveira RA G, Lima EOI, Farias NMP, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. Braz J. Pharmacog. 2006;16(2):197-201.

Lima Jr JF, Dimenstein M. A fitoterapia na saúde pública em Natal/RN: visão do odontólogo. Saúde Rev. 2006;8(19):37-44.

Loberto JC, Martins CP, Santos SF, Cortelli JR, Jorge AOC. *Staphylococcus* spp in the oral cavity and periodontal pockets of chronic periodontitis patiens. Braz J Microbiol. 2004; 35:64-8.

Loguercio C, Federico A, Tuccillo C, Terracciano F, D'Auria MV, De Simone C, et al. Beneficial effects of a probiotic on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases. J Clin Gastroenterol. 2005;39(6): 540-3.

Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2002. 512p.

Manohar V, Ingram C, Gray J, Nadeem A. T, Echard BW, Bagchi D, Preuss HG. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. Mol Cell Biochem. 2001;228:111-17.

Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. J Clin Periodontol. 2005;32(Suppl. 6):7–15.

Marsh PD. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. J. Dent. Res. 1992;71(7):1431-38.

Maza JL, Elguezabal BS, Carlota P, Ellacuria J, Soler I, Ponton J. *Candida albicans* adherence to resin-composite restorative dental material: influence of whole human saliva. Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002;94:589-92.

Mickel AK, Nguyen TH, Chole S. Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2002; 28(12):815-18.

Mbosso EJT., Ngouela S, Nguedia JCA, Beng VP, Rohmer M, Tsamo E.,. In vitro antimicrobial activity of extracts and compounds of some selected medicinal plants from Cameroon. J Ethnopharmacol. 2010;128:476-81.

Moran J, Addy M, Roberts SA. Comparison of natural product, triclosan and chlorhexidine mouthrinses on 4-day plaque regrowth. J Clin Periodontol. 1992;9(8):578-82.

Mosihuzzaman M, Choudhary MI. Protocols on safety, efficacy, standardization, and documentation of herbal medicine. Pure Appl. Chem. 2008; 80(10):2195–230.

Murdoch-Kinch CA, Mclean ME. Minimally invasive dentistry. JADA. 2003; 134:87-95.

Napimoga MH, Höfling JF, Klein MI, Kamiya RU, Gonçalves RB. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. J Oral Science. 2005;47(2):59-64.

Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and photochemical on antibiotic-resistant bacteria. *Braz. J. Microbiol.* 2000;31:247-56.

Nicoletti MA, Bugno A, Orsine EMA, Zenebon O. Estudo da atividade antimicrobiana do extrato fluido da *C. zedoaria* Roscoe - determinação da concentração mínima inibitória. *Rev Bras Farm.* 2003;84(2):39-41.

Nostro A, Roccaro AS, Bisignano G, Marino A, Cannatelli MA, Pizzimenti FC, Cioni PL, Procopio F, Blanco AR. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Med Microbiol.* 2007; 56: 519–23.

O’Gara J, Humphreys H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol.* 2001;50:582-7.

Onawunmi G. Evaluation of the antifungal activity of Lemon grass oil. *Ins J Crude Res.* 1989;27(2):121-26.

O’Sullivan JM, Jenkinson HF, Cannon RD. Adhesion of *Candida albicans* to oral streptococci is promoted by selective adsorption of salivary proteins to the streptococcal. *Microbiol.* 2000;146:41-8.

Pallin DJ, Egan DJ, Pelletier AJ, Espinola JA, Hooper DC, Camargo CA. Increased us emergency department visits for skin and soft tissue infections, and changes in antibiotic choices, during the emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Emerg Med.* 2008;3(51):291-98.

Palombo EA. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2009;1-15.

Pereira AV, Farago PV, Pereira FPM, Brito FS, Caranello VFL. Análise de soluções aquosas magistrais de *C. zedoaria* Roscoe. *Ci Biol Saúde.* 2004;10(2): 39-47.

Pin ML, Abdo RC, Machado MA, da Silva RM, Pavarini A, Marta RN. In vitro evaluation of cariostatic action of esthetic restorative materials in bovine teeth under severe cariogenic challenge. *Oper Dent*. 2005;30:368-75.

Puatanachokchai R, Kishida H, Denda A, Murata N, Konishi Y, Vinitketkumnue U, et al. Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus*, Stapf) extract on the early phase of hepatocarcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine in male Fisher 344 rats. *Cancer Lett*. 2002;183(1):9-15.

Queralt I, Ovejero M, Carvalho ML, Marques AF, Llabrés JM. Quantitative determination of essential and trace element content of medicinal plants and their infusions by XRF and ICP techniques. *X-Ray Spectrom*. 2005;34:213-17

Querido SMR. Microrganismos superinfectantes na cavidade bucal de indivíduos submetidos a antibioticoterapia para tratamento de tuberculose pulmonar. [tese]. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Univ Estadual Paulista. 2006; 157p.

Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, Lopes-Ripot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;98:53-9.

Richardson M. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56(1):5-11.

Rojas A, Hernandez L, Pereda-Miranda R, Mata R. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J Ethnopharm*. 1992;35:275-83.

Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Locka O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2003;88:199-204.

Rossi F, Andreazzi DB. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005. 118p.

Sandrini, JC.; Navarro, DF, Rocha, JCF, Ribeiro, PG, Kozlowski Jr. VA, Efeitos do extrato de *Curcuma zedoaria* sobre a placa dental e gengivite em humanos – Avaliação clínica. Rev. Periodontia. 1997;6: 3-6.

Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figuraueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. Braz J Microbiol. 2004;35:275-80.

Schuck VJA, Fratini M, Rauber CS, Henriques A, Schapoval EES. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. Rev Bras Ci Farm. 2001;37:45-9.

Schulz V, Hansel R, Tyler VE. Fitoterapia racional. 4ed São Paulo: Manole, 2002, 208p.

Shalhav M, Fuss Z, Weiss EI. In vitro antibacterial activity of glass ionomer endodontic sealer. J Endod. 1997;23(10)616-19.

Siqui AC, Sampaio ALF, Sousa MC, Henriques MGMO, Ramos, MFS. Óleos essenciais – potencial antiinflamatório. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento. 2000;16:38-43.

Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeast, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. Oral Microbiol Immunol. 1988;3:47-52.

Soll DR. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. Acta Tropica. 2002;81:101–10.

Soule, JA. *Tagetes minuta*: a potential new herb from South America. New Crops. New York, 1993

Sousa FCF, Melo CTV, Citó MCO, Félix FHC, Vasconcelos SMM, Fonteles MMF, Filho JMB, Viana GSB. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. Braz J Pharm. 2008;18(4): 642-54.

Souza CAS, Avancini CAM, Wiest JM. Atividade antimicrobiana de *Tagetes minuta* L. - Compositae (Chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Braz J Vet Res Anim Sci. 2000;37(6):429-33.

Spellberg B, Guidos R, Gilbert D, Bradley J, Boucher HW, Scheld WM, Bartlett JG, Jr Edwards J. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the infectious diseases society of America. Clin Infect Dis. 2008; 46:155–64.

Tampieri MP, Galuppi R, Macchioni F, Carelle MS, Falcioni L, Cioni PL. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. Mycopathologia [serial on line]. 2005;159(3):339-45.

Teske M, Trenitini AMM. Herbarium: compendium de fitoterapia. 3 ed Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico; 1994.

Trülzsch K, Grabein B, Schumann P, Mellmann A, Antonenka U, Heesemann J, Becker K. *Staphylococcus pettenkoferi* sp. a novel coagulase-negative *Staphylococcal* species isolated from human clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol. 2007;57:1543–48.

Tse H, Tsoi HW, Leung SP, Lau SKP, Woo PCY, Yuen KY. Genome announcements. Complete genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* strain HKU09-01. J Bacteriol. 2010;192(5):1471–72.

Vicente VA, Poletto MM, Neiva IF, Pinto JVT, Braga SF, Moreira M, Lavoranti OJ. Relação entre prevalência da doença cárie e risco microbiológico. Cienc Odontol Bras. 2008;11(1):44-8.

Vukovic N, Milosevic T, Sukdolak S, Solujic S. Antimicrobial activities of essential oil and methanol extract of *Teucrium montanum*. Evid Based Complement Alternat Med. 2007;4(1):17-20.

Wasicky R, Akisue G. Um aparelho aperfeiçoado para a extração de óleos essenciais. Rev Fac Farm Bioquim. 1969;7(2):339-405.

Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect Dis 2005;5:751-62.

Wilson B, Abrahamb G, Manjua VS, Mathewc M, Vimala B, Sundaresan S, Nambisan B. Antimicrobial activity of *Curcuma zedoaria* and *Curcuma malabarica* tubers. J Ethnopharmacol. 2005;99:147–51.

Xavier CAC, Oporto CFO, Silva MP, Silveira IA, Abrantes MR. Prevalência de *Staphylococcus aureus* em manipuladores de alimentos das creches municipais da cidade do Natal/RN. Rev Bras Anal Clin. 2007;39(3):165-8.

Ye J. Application of gas chromatography--mass spectrometry in research of traditional Chinese medicine. Chemical Papers.2009;63(5)506–11.

APÊNDICE A – Dados individuais dos ensaios realizados para cada grupo de biofilme

Tabela 7 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e controle, no grupo G1 de biofilme de *C. albicans*. Os dados referem-se a levedura *C. albicans*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	3,788	5
2	4,724	5,401
3	4,113	5,130
4	4,203	5,152
5	4,255	4,612
6	4,569	4,744
7	4,906	5,264
8	3,653	5,534
9	4,550	5,428
10	4,556	4,755
11	4,893	5,365
12	5,000	5,274
Média	4,428	5,139
Desvio Padrão	0,432	0,300

Tabela 8 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e controle, no grupo G2 de biofilme de *S. aureus*. Os dados referem-se a bactéria *S. aureus*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	6,150	6,925
2	6,235	6,910
3	6,390	6,408
4	6,459	6,691
5	6,374	6,619
6	6,623	6,875
7	6,633	7,017
8	6,567	6,569
9	6,369	6,495
10	6,117	6,711
11	6,502	7,112
12	6,438	6,993
Média	6,405	6,777
Desvio Padrão	0,170	0,226

Tabela 9 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e controle, no grupo G3 de biofilme de *S. mutans*. Os dados referem-se a bactéria *S. mutans*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	6,738	6,967
2	6,318	6,736
3	6,255	7,049
4	6,149	6,852
5	6,468	6,864
6	6,441	6,627
7	6,444	6,515
8	5,423	6,593
9	5,763	6,662
10	6,033	7,079
11	5,694	6,502
12	5,724	6,273
Média	6,121	6,727
Desvio Padrão	0,396	0,244

Tabela 10 - Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e controle, no grupo G4 de biofilme de *C. albicans* e *S. aureus*. Os dados referem-se a levedura *C. albicans*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	2,544	3,462
2	2,000	3,311
3	2,477	3,161
4	2,544	4,397
5	2,301	3,477
6	2,812	3,389
7	2,602	3,311
8	3,267	3,556
9	2,544	3,267
10	2,698	3,462
11	2,653	3,243
12	2,903	3,505
Média	2,612	3,462
Desvio Padrão	0,311	0,318

Tabela 11 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e controle, no grupo G4 de biofilme de *C. albicans* e *S. aureus*. Os dados referem-se a bactéria *S. aureus*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	4,890	5,033
2	4,785	5,214
3	4,660	4,845
4	4,700	4,982
5	5,036	5,086
6	4,659	4,977
7	4,901	4,903
8	4,814	5,123
9	4,850	4,851
10	4,857	5,099
11	4,918	4,994
12	4,956	5,151
Média	4,836	5,022
Desvio Padrão	0,117	0,118

Tabela 12 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e controle, no grupo G5 de biofilme de *C. albicans* e *S. mutans*. Os dados referem-se a levedura *C. albicans*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	4,439	5,000
2	4,842	5,170
3	4,380	4,982
4	3,845	5,248
5	4,607	5,253
6	4,130	4,964
7	4,973	5,004
8	4,352	5,045
9	4,431	5,117
10	4,190	5,408
11	4,279	4,778
12	4,301	4,591
Média	4,398	5,047
Desvio Padrão	0,305	0,219

Tabela 13 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e controle, no grupo G5 de biofilme de *C. albicans* e *S. mutans*. Os dados referem-se a bactéria *S. mutans*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	4,956	5,043
2	4,544	4,982
3	4,982	5,086
4	4,732	4,845
5	4,658	4,954
6	4,414	4,736
7	4,243	4,838
8	4,230	4,736
9	4,822	5,783
10	4,423	4,880
11	4,643	5,631
12	5,136	5,477
Média	4,649	5,083
Desvio Padrão	0,292	0,353

Tabela 14 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e controle, no grupo G6 de biofilme de *S. mutans* e *S. aureus*. Os dados referem-se a bactéria *S. mutans*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	4,602	5,146
2	4,903	5,477
3	4,301	5,230
4	4,602	4,778
5	5,041	5,819
6	5,041	5,672
7	4,903	5,672
8	4,602	4,602
9	5,243	5,243
10	4,301	4,700
11	4,602	4,602
12	4,845	5,041
Média	4,749	5,165
Desvio Padrão	0,295	0,433

Tabela 15 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e controle, no grupo G6 de biofilme de *S. mutans* e *S. aureus*. Os dados referem-se a bactéria *S. aureus*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	7,000	7,036
2	6,817	7,158
3	6,891	7,309
4	6,787	7,146
5	6,876	7,146
6	7,125	7,217
7	6,940	7,096
8	6,702	7,036
9	6,801	7,095
10	7,102	7,102
11	6,908	7,017
12	6,789	6,975
Média	6,896	7,111
Desvio Padrão	0,129	0,092

Tabela 16 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e controle, no grupo G de biofilme de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans*. Os dados referem-se a levedura *C. albicans*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	4,300	4,752
2	5,150	5,021
3	4,423	5,700
4	4,903	5,174
5	4,638	4,676
6	4,653	5,684
7	4,361	4,889
8	4,267	4,447
9	4,447	4,792
10	3,602	4,767
11	4,204	5,701
12	4,130	4,886
Média	4,423	5,041
Desvio Padrão	0,395	0,432

Tabela 17 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e controle, no grupo G de biofilme de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans*. Os dados referem-se a bactéria *S. aureus*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	5,516	6,481
2	5,932	6,480
3	5,778	6,204
4	5,643	6,492
5	5,453	6,498
6	5,753	6,477
7	6,120	6,477
8	6,026	6,477
9	5,602	6,107
10	5,830	6,175
11	5,712	6,438
12	5,757	5,817
Média	5,761	6,343
Desvio Padrão	0,198	0,218

Tabela 18 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e controle, no grupo G7 de biofilme de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans*. Os dados referem-se a bactéria *S. mutans*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	5,260	5,349
2	5,209	5,243
3	5,313	5,352
4	5,380	5,477
5	5,575	5,653
6	5,056	5,439
7	5,716	5,707
8	5,695	5,240
9	5,198	5,643
10	5,627	5,633
11	5,012	5,068
12	5,350	5,398
Média	5,360	5,430
Desvio Padrão	0,230	0,190

Tabela 19 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Tagetes minuta* e controle, no grupo G1 de biofilme de *C. albicans*. Os dados referem-se a levedura *C. albicans*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	5,000	5,619
2	4,975	6,566
3	4,980	5,471
4	4,470	5,468
5	4,685	5,411
6	4,602	5,589
7	4,939	5,617
8	4,947	5,580
9	5,051	5,551
10	5,091	5,033
11	5,526	5,544
12	5,079	5,437
Média	4,946	5,574
Desvio Padrão	0,270	0,350

Tabela 20 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Tagetes minuta* e controle, no grupo G2 de biofilme de *S. aureus*. Os dados referem-se a bactéria *S. aureus*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	6,947	7,621
2	6,964	7,228
3	6,716	6,954
4	6,301	7,394
5	7,158	7,791
6	6,544	7,627
7	6,544	7,499
8	7,766	7,726
9	6,114	7,847
10	6,982	7,233
11	7,384	7,610
12	7,811	7,811
Média	6,939	7,529
Desvio Padrão	0,535	0,277

Tabela 21 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Tagetes minuta* e controle, no grupo G3 de biofilme de *S. mutans*. Os dados referem-se a bactéria *S. mutans*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	5,556	6,781
2	6,193	6,265
3	6,100	6,517
4	6,057	6,589
5	5,982	6,582
6	6,033	6,582
7	5,591	6,666
8	6,453	6,346
9	5,968	6,338
10	5,591	6,431
11	5,591	6,447
12	6,023	6,380
Média	5,921	6,494
Desvio Padrão	0,282	0,152

Tabela 22 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Tagetes minuta* e controle, no grupo G4 de biofilme de *C. albicans* e *S. aureus*. Os dados referem-se a levedura *C. albicans*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	4,672	5,623
2	5,079	5,373
3	5,225	5,633
4	5,391	6,500
5	5,017	5,387
6	4,937	5,531
7	4,312	5,505
8	4,845	5,665
9	4,866	4,819
10	4,518	5,662
11	5,064	5,662
12	4,939	5,662
Média	4,906	5,586
Desvio Padrão	0,297	0,375

Tabela 23 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Tagetes minuta* e controle, no grupo G4 de biofilme de *C. albicans* e *S. aureus*. Os dados referem-se a bactéria *S. aureus*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	6,982	7,288
2	7,584	7,421
3	7,556	7,681
4	6,322	7,822
5	8,483	7,606
6	5,477	7,375
7	7,401	7,398
8	7,735	7,283
9	7,497	7,459
10	7,593	7,164
11	7,305	7,627
12	7,037	7,354
Média	7,248	7,456
Desvio Padrão	0,756	0,191

Tabela 24 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Tagetes minuta* e controle, no grupo G5 de biofilme de *C. albicans* e *S. mutans*. Os dados referem-se a levedura *C. albicans*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	4,964	5,991
2	5,158	6,170
3	4,607	5,724
4	5,287	5,863
5	5,086	5,544
6	4,322	6,021
7	4,792	5,914
8	5,072	6,494
9	5,209	6,350
10	4,525	6,079
11	4,380	5,724
12	5,100	5,724
Média	4,875	5,967
Desvio Padrão	0,338	0,278

Tabela 25 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Tagetes minuta* e controle, no grupo G5 de biofilme de *C. albicans* e *S. mutans*. Os dados referem-se a bactéria *S. mutans*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	4,711	6,300
2	4,658	6,322
3	4,371	6,716
4	4,685	5,628
5	4,447	5,628
6	4,926	5,204
7	3,477	6,025
8	4,000	6,079
9	3,477	5,245
10	4,550	4,894
11	4,607	4,894
12	4,361	4,895
Média	4,356	5,653
Desvio Padrão	0,470	0,633

Tabela 26 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Tagetes minuta* e controle, no grupo G6 de biofilme de *S.mutans* e *S. aureus*. Os dados referem-se a bactéria *S. mutans*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	2,929	4,102
2	2,954	4,086
3	3,895	4,077
4	2,477	4,049
5	0,000	4,090
6	3,556	3,638
7	2,813	3,892
8	3,903	3,946
9	3,728	3,813
10	3,389	4,119
11	3,875	3,991
12	2,778	3,991
Média	3,020	3,983
Desvio Padrão	1,080	0,143

Tabela 27 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Tagetes minuta* e controle, no grupo G6 de biofilme de *S. mutans* e *S. aureus*. Os dados referem-se a bactéria *S.aureus*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	7,278	7,602
2	7,170	7,536
3	7,314	7,647
4	7,350	7,602
5	7,140	7,536
6	7,348	7,649
7	7,346	7,350
8	7,033	7,453
9	7,582	7,516
10	7,477	7,491
11	7,394	7,431
12	7,314	7,301
Média	7,312	7,510
Desvio Padrão	0,148	0,111

Tabela 28 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Tagetes minuta* e controle, no grupo G7 de biofilme de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans*. Os dados referem-se a levedura *C. albicans*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	3,845	4,771
2	3,477	4,556
3	4,060	4,686
4	4,176	4,568
5	4,079	4,498
6	3,602	4,556
7	3,699	4,190
8	3,903	4,607
9	4,204	4,342
10	3,477	4,525
11	3,478	4,525
12	3,478	4,525
Média	3,790	4,529
Desvio Padrão	0,291	0,149

Tabela 29 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Tagetes minuta* e controle, no grupo G7 de biofilme de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans*. Os dados referem-se a bactéria *S. aureus*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	6,991	7,198
2	6,700	6,932
3	6,685	7,806
4	6,716	7,288
5	6,484	7,114
6	6,398	7,643
7	7,358	7,354
8	6,455	6,842
9	6,267	7,225
10	7,193	7,041
11	6,544	7,434
12	6,845	7,269
Média	6,720	7,262
Desvio Padrão	0,329	0,277

Tabela 30 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Tagetes minuta* e controle, no grupo G7 de biofilme de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans*. Os dados referem-se a bactéria *S. mutans*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	2,000	5,362
2	2,000	5,176
3	2,000	5,152
4	3,275	4,700
5	3,217	4,681
6	2,000	4,883
7	2,812	4,204
8	3,724	4,400
9	2,000	4,152
10	3,978	4,880
11	2,000	3,400
12	3,267	3,700
Média	2,690	4,557
Desvio Padrão	0,772	0,605

Tabela 31 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Curcuma zedoaria* e controle, no grupo G1 de biofilme de *C. albicans*. Os dados referem-se a levedura *C. albicans*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	4,146	5,000
2	4,100	5,047
3	4,176	4,908
4	3,602	4,906
5	3,814	4,816
6	3,845	5,027
7	3,954	5,03
8	4,217	5,155
9	3,740	4,872
10	3,954	5,133
11	3,000	5,340
12	0,000	5,000
Média	3,550	5,021
Desvio Padrão	1,160	0,144

Tabela 32 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Curcuma zedoaria* e controle, no grupo G2 de biofilme de *S. aureus*. Os dados referem-se a bactéria *S. aureus*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	6,854	7,358
2	8,240	7,895
3	6,991	7,278
4	6,832	7,338
5	7,000	7,255
6	6,061	7,167
7	6,782	6,778
8	7,140	7,356
9	6,781	7,214
10	7,193	7,305
11	6,423	7,437
12	6,217	7,385
Média	6,876	7,314
Desvio Padrão	0,555	0,250

Tabela 33 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Curcuma zedoaria* e controle, no grupo G3 de biofilme de *S mutans*. Os dados referem-se a bactéria *S. mutans*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	3,041	6,380
2	0,000	5,763
3	3,322	4,700
4	0,000	6,146
5	3,748	5,415
6	0,000	6,748
7	0,000	5,365
8	3,732	6,465
9	3,934	5,531
10	0,000	5,531
11	3,322	6,322
12	0,000	5,322
Média	1,760	5,808
Desvio Padrão	1,850	0,603

Tabela 34 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Curcuma zedoaria* e controle, no grupo G4 de biofilme de *C. albicans* e *S. aureus*. Os dados referem-se a levedura *C. albicans*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	5,021	5,574
2	5,662	5,550
3	4,929	5,176
4	5,041	5,842
5	4,397	4,643
6	5,322	5,744
7	5,623	5,618
8	5,556	5,770
9	5,596	5,580
10	5,217	5,763
11	5,290	5,568
12	5,041	5,782
Média	5,225	5,551
Desvio Padrão	0,368	0,336

Tabela 35 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Curcuma zedoaria* e controle, no grupo G4 de biofilme de *C. albicans* e *S. aureus*. Os dados referem-se a bactéria *S. aureus*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	7,292	7,288
2	7,305	7,421
3	7,182	7,681
4	7,204	7,627
5	6,484	7,822
6	7,127	7,606
7	7,526	7,375
8	7,305	7,398
9	7,255	7,283
10	7,334	7,460
11	7,041	7,164
12	7,041	7,354
Média	7,175	7,457
Desvio Padrão	0,256	0,191

Tabela 36 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Curcuma zedoaria* e controle, no grupo G5 de biofilme de *C. albicans* e *S. mutans*. Os dados referem-se a levedura *C. albicans*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	4,311	5,991
2	3,875	6,170
3	3,875	5,724
4	3,544	5,863
5	4,000	5,544
6	4,423	6,021
7	4,021	5,914
8	3,653	6,494
9	4,130	6,350
10	4,525	6,079
11	3,000	6,079
12	3,000	4,079
Média	3,863	5,859
Desvio Padrão	0,496	0,616

Tabela 37 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Curcuma zedoaria* e controle, no grupo G5 de biofilme de *C. albicans* e *S. mutans*. Os dados referem-se a bactéria *S. mutans*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	4,512	6,301
2	3,602	6,322
3	4,000	5,716
4	3,845	5,623
5	4,041	5,628
6	4,505	6,204
7	4,097	6,079
8	3,699	6,245
9	4,278	5,895
10	4,484	6,025
11	3,602	5,623
12	3,602	5,623
Média	4,022	5,941
Desvio Padrão	0,360	0,289

Tabela 38 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Curcuma zedoaria* e controle, no grupo G6 de biofilme de *S. mutans* e *S. aureus*. Os dados referem-se a bactéria *S. mutans*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	4,255	5,869
2	4,643	5,613
3	4,447	4,848
4	4,176	6,334
5	4,278	5,991
6	4,176	5,889
7	4,431	5,415
8	4,380	5,695
9	4,322	6,049
10	0,000	6,027
11	4,322	6,049
12	4,322	6,049
Média	3,980	5,819
Desvio Padrão	1,260	0,390

Tabela 39 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Curcuma zedoaria* e controle, no grupo G6 de biofilme de *S. mutans* e *S. aureus*. Os dados referem-se a bactéria *S. aureus*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	5,279	6,716
2	0,000	6,722
3	5,663	5,924
4	6,322	6,602
5	5,796	6,408
6	5,439	6,342
7	5,623	5,380
8	5,845	6,499
9	5,312	6,309
10	6,217	5,799
11	6,217	5,799
12	4,845	6,499
Média	5,210	6,250
Desvio Padrão	1,70	0,426

Tabela 40 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Curcuma zedoaria* e controle, no grupo G7 de biofilme de *C. albicans*, *S. mutans* e *S. aureus*. Os dados referem-se a levedura *C. albicans*.

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	5,648	6,164
2	4,875	6,373
3	4,653	6,176
4	4,397	5,686
5	5,060	5,398
6	5,190	5,667
7	5,602	5,079
8	5,423	5,080
9	5,146	5,643
10	5,190	6,140
11	5,190	5,505
12	5,176	6,146
Média	5,129	5,755
Desvio Padrão	0,360	0,443

Tabela 41 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Curcuma zedoaria* e controle, no grupo G5 de biofilme de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans*. Os dados referem-se a bactéria *S. aureus*.

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	7,617	7,2
2	7,411	6,932
3	7,064	7,806
4	6,998	7,288
5	7,220	7,114
6	6,848	7,643
7	7,187	7,354
8	6,439	6,842
9	7,149	7,225
10	7,181	7,041
11	7,305	7,434
12	7,127	7,269
Média	7,129	7,262
Desvio Padrão	0,292	0,277

Tabela 42 – Números de UFC/mL (Log10), médias e desvio-padrão obtidos nos ensaios realizados com óleo essencial de *Curcuma zedoaria* e controle, no grupo G7 de biofilme de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans*. Os dados referem-se a bactéria *S. mutans*

Corpo de prova	Óleo	Controle
1	5,079	5,362
2	4,700	5,176
3	4,699	6,152
4	5,371	5,700
5	6,079	5,681
6	5,311	5,883
7	5,398	5,204
8	5,724	5,398
9	5,097	6,152
10	5,217	5,883
11	5,361	5,398
12	5,041	5,699
Média	5,257	5,641
Desvio Padrão	0,390	0,337

ANEXO A: Parecer do Comitê de ética

 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - M. São Diniz
CEP 12281-070 - F. (12) 3947-9029
Fax. (12) 3947-9010 / esuly@flosj.unesp.br

 **CERTIFICADO**
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 01/2008-PH/CEP, sobre
"Avaliação da atividade dos óleos essenciais de *Cymbopogon*
citratus(DC). *Stapf*, *Casearia sylvestris* SW. e *Curcuma zedoaria*
Roscoe, frente aos microrganismos *Cândida* spp., *staphylococcus*
spp. e *Streptococcus mutans*" sob a responsabilidade de **ROSILENE**
BATISTA DE AGUIAR ALMEIDA, está de acordo com os Princípios
Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa,
envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho
Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 11 de março de 2008.



Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi
Coordenadora do CEP/HUMANOS/FOSJC

ANEXO A: Parecer do Comitê de ética

Almeida RBA, Evaluation of activity of essential oil Cymbopogon citratus (D.C.) Stapf, Tagetes minuta L. and Curcuma zedoaria Roscoe against microorganisms Candida spp., Staphylococcus spp. and Streptococcus mutans [tese]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, São Paulo State University; 2010.

ABSTRACT

In the search for preventive and curative means for periodontal disease and tooth decay, herbal-purpose fungicide, antibacterial and anti-inflammatory have been investigated. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity using the essential oils of Cymbopogon citratus (D.C.) Stapf, Curcuma zedoaria Roscoe and Tagetes minuta L. on strains of Staphylococcus spp., Streptococcus mutans and Candida spp. in planktonic and biofilm growth. For the study of microorganisms in planktonic growth, were determined Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Microbicidal Concentration of nine clinical strains and one ATCC for each species: C. albicans, C. tropicalis, C. glabrata, S. aureus, S. epidermidis and S. mutans. To assess the effects of essential oils in biofilm, was used strains of Candida albicans (ATCC 18804), Staphylococcus aureus (ATCC 6538) and Streptococcus mutans (ATCC 35688) alone and in associations in acrylic resin discs immersed in sterile brain heart infusion broth (BHI) containing 5% sucrose, inoculated with microbial suspension and incubated for 5 days. On the fifth day, the discs were washed in sterile saline solution in order to remove loosely bound material. Next, the acrylic resin discs were washed and placed in contact with essential oils for 5 min. The number of CFU obtained in each biofilm (CFU/mL) were subjected to descriptive statistical analysis using Minitab software considering with significance level $p \leq 0.05$. It was also performed scanning electron microscopy (SEM) acrylic resin disc with biofilm with treatment and control. It was identified significant reductions in the number of colony forming units (CFU/mL) in both planktonic and biofilm associated. The largest reductions occurred in the treatment of essential oil of C. citratus, followed by oil of T. minuta and C. zedoaria. We conclude that the essential oils of Cymbopogon citratus, Tagetes minuta and Curcuma zedoaria showed bacteriostatic activity, fungistatic and microbicide on all strains of Staphylococcus spp., Streptococcus mutans and Candida spp. in planktonic form. The strains most sensitive for minimal microbicidal concentration of essential oil of C. citratus were C. albicans, C. tropicalis and C. glabrata followed by strains of S. epidermidis,

S. aureus and S. mutans. The strains most sensitive for minimal microbicidal concentration of essential oil of T. minuta draft went to C. albicans, C. tropicalis, C. glabrata; then followed by the bacterial strains S. aureus and S. epidermidis and S. mutans. The strains most sensitive for minimal microbicidal concentration of essential oil from oil C. zedoaria and C. albicans was the most resistant was S. mutans. The microbial activity against S. aureus, S. mutans and C. albicans when arranged in single and mixed biofilms having significant reductions in CFU/mL of microorganisms.

Keywords: Biofilm. Microbial sensitivity test. Essential oils. Candida spp. Staphylococcus spp. Streptococcus mutans.