

MARIA ALCIONÉIA CARVALHO DE OLIVEIRA

**INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES
ANTICARIOGÊNICAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS:
atividade antimicrobiana e caracterização química**



2012

MARIA ALCIONÉIA CARVALHO DE OLIVEIRA

**INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTICARIOGÊNICAS DE
ÓLEOS ESSENCIAIS: atividade antimicrobiana e caracterização
química**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito

Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti

São José dos Campos

2012

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; 2010.

- O4i Oliveira, Maria Alcionéia Carvalho de.
Investigação das propriedades anticariogênicas de óleos essenciais: atividade antimicrobiana e caracterização química / Maria Alcionéia Carvalho de Oliveira. - São José dos Campos : [s.n.], 2012.
96. : il.
- Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2012.
Orientador: Profa. Dra Cristiane Yumi Koga-Ito
Co-Orientador: Fernanda Lourenção Brighenti.
1. Cárie dentária. 2. Óleos essenciais. 3. Terpenóides. I. Koga-Ito, Cristiane Yumi. II. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. IV. UNESP – Univ Estadual Paulista. V. 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, 29 de Junho de 2012 .

Assinatura :

E-mail: maria.oliveira@fosjc.unesp.br

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito (Orientador)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Profa. Adj. Mônica Fernandes Gomes

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Prof. Assoc. Marcos José Salvador

Instituto de Biologia
UNICAMP – Univ Estadual de Campinas

São José dos Campos, 24 de julho de 2012.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **José Venâncio de Oliveira** e **Maria Lucilene C. de Oliveira**, pelo esforço imensurável, carinho e paciência que sempre me apresentaram. Agradeço por sempre acreditarem em mim.

À minha irmã, **Maria Alcione Carvalho de Oliveira**, que sempre me apoiou, sendo paciente e acreditando em meus sonhos. Obrigada por tudo.

Ao meu noivo, **Thiago Rodrigo de Campos**, por ter orgulho de mim, por me ajudar, por me escutar, por chorar comigo e sempre me apoiar com um carinho incontestável.

Aos meus sobrinhos, **Thacila de Oliveira Marques** e **Guilherme Oliveira B. de Andrade**, por me fazer a tia mais orgulhosa do mundo.

A minha tia, **Antonia Helena Gonçalves**, que sempre me ajudou muito, com muito carinho e simplicidade.

Ao meu eterno amigo, **Alberto Massao Imai** (*in memoriam*), por me incentivar, me ensinar e me fazer acreditar que era capaz.

AGRADECIMENTOS

À minha amada Orientadora Profa Dra. Cristiane Yumi Koga-Ito, por ter me aceitado como sua orientanda, por me ensinar, por ter paciência e por me tratar sempre com muito carinho. Não tenho palavras para expressar o quanto sou grata pela ajuda e ensinamentos.

A minha co-orientadora Dra. Fernanda Lourenção Brighenti por tanto me ensinar e querer sempre o melhor de cada um. Obrigada “Fer”, por me ajudar muito.

Ao meu amigo e técnico do laboratório de Histologia e Embriologia Walter Cruz, que desde a iniciação dos meus trabalhos científicos, esteve sempre pronto a ajudar, e melhor sem querer absolutamente nada em troca. Walter acredite você é realmente uma pessoa iluminada, que veio ao mundo para fazer diferença. Obrigada sempre pelo carinho e dedicação.

A minha amiga Gabriela Santana, pelo incentivo, por me ajudar, por me fazer rir e pela companhia. Serei eternamente grata.

Aos professores da Disciplina de Histologia e Embriologia, Miguel, Luana e Mariana e Dona Zélia, por serem sempre tão atenciosos e carinhosos comigo.

A minha amiga Aline Chiodi Borges, pelos ensinamentos, convívio, ajuda, paciência e muita alegria. Não consigo expressar a minha gratidão com palavras. Obrigada por tudo.

A minha amiga Jorgiana Sangalli, pela convivência maravilhosa que tivemos. Jô, o laboratório e “Araçatuba” não são os mesmos depois de você. Obrigada por todo o apoio.

A Prof^a Mônica Fernandes Gomes por ter aberto as portas do mundo científico.

A Dra Maria da Graças Vilela-Goulart, por me aceitar, por acreditar em mim, por me ensinar e pelo carinho que perdura por todos esses anos. Professora, serei eternamente grata por tudo o que fez por mim.

A Valerinha, que sempre nos recebe com uma alegria contagiante.

Aos funcionários da seção de pós-graduação, Rose, Bruno e Erena, por sempre estarem dispostos a nos ajudar.

Ao professor Marcos José Salvador pelo ensinamento e colaboração.

Aos meninos do laboratório: Bruno, Dani e Gui, pelas risadas e pronto atendimento. Amigos, fica registrada a minha grande admiração por vocês.

Aos funcionários Carlos Guedes (Dept. de Pesquisa); Elízete Wenzel (Seção Técnica de Saúde); Carlos Eduardo de Oliveira; (Seção Técnica de Informática), Cláudia do Carmo e Dimas Pereira (Serv. Auxiliares); Srs. Toninho, Marcos e Lourival (Biotério); Zumira, Ana Paula, Sr. João e Cida, Rafael, Sr. Jorge, Guarú, Sr. Gustavo (Manutenção); Srs. Edson, Hélio, Gilson e demais colaboradores (Portaria), por sempre estarem dispostos a ajudar. Acredite vocês contribuíram muito.

As meninas do restaurante “Nossa Cantina”, Dona Wilma, Solange e Vanessa, obrigada pelo carinho apresentado diariamente.

A todos, que de alguma forma me incentivaram ou ajudaram no cumprimento desta etapa

*“Enquanto todo mundo espera a cura do mal,
e a loucura finge que isso tudo é normal, eu finjo ter
paciência”. Lenine*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Aspectos microbiológicos da cárie	19
2.2 Uso de plantas medicinais na Odontologia	25
2.3 Óleos essenciais e seu uso na Odontologia	28
2.3.1 <i>Hyptis spicigera</i>	30
2.3.2 <i>Thymus vulgaris</i>	32
2.3.3 Gênero <i>Cymbopogon</i>	33
2.3.4 Citral.....	35
2.3.5 Eucaliptol (1,8 cineole).....	35
3 PROPOSIÇÃO.....	36
4 MATERIAL E MÉTODO.....	37
4.1 Aprovação no Comitê de Ética com Seres Humanos	37
4.2 Obtenção dos óleos essenciais	37
4.3 Cepas de referências e condições de crescimento	38
4.4 Amostras clínicas	38
4.5 Coleta de dentina cariada	39
4.6 Teste de difusão em ágar	40
4.7 Obtenção dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).....	41

4.8 Influência do óleo essencial sobre o crescimento de biofilme em microcosmo	42
4.8.1 Obtenção do microcosmo de saliva	43
4.8.2 Condições de crescimento do Biofilme	43
4.8.3 Tratamento do biofilme formado	44
4.9 Efeito do óleo essencial sobre a adesão inicial de micro-organismos do microcosmo ao esmalte dentário	45
4.9.1 Obtenção dos fragmentos de dentes	45
4.9.2 Tratamento do biofilme de microcosmo em esmalte dentário ...	46
4.10 Análise do perfil químico dos óleos essenciais mais ativos	47
5 RESULTADOS	48
5.1 Testes de difusão em Ágar	48
5.2 Atividade antimicrobiana sobre cepas padrão e isolados clínicos -Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos e terpenos	49
5.2.1 Resultados para cepas padrão	49
5.2.2. Resultados obtidos para os isolados clínicos	51
5.3 Influência do óleo essencial sobre a formação de biofilme ...	55
5.4 Efeito dos óleos essenciais sobre a adesão inicial de microcosmo ao esmalte dentário	58
5.5 Caracterização química dos óleos essenciais	60
6 DISCUSSÃO	66
7 CONCLUSÃO	74
8 REFERÊNCIAS	75
ANEXO A.....	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- (A) Diluições seriadas entre os poços. Foram transferidos 50 µL a cada poço. (B); Subcultura de ágar BHI.....	43
Figura 2 - (A) Suporte metálico utilizado para acoplar as lamínulas; (B) Lamínulas de vidros no suporte que foi inserido em placa de 24 poços.....	45
Figura 3 - (A) Corte inicial de dentes, utilizando disco de carburundum; (B) Corte sequencial dos fragmentos, utilizando ponta diamantada.....	47
Figura 4 - Teste de difusão realizado com <i>Streptococcus sobrinus</i> : (A): <i>Cymbopogon martinii</i> ; (B): <i>C. citratus</i> ; (C): <i>C. flexuosus</i> ; (D): Citral; (E): Clorexidina; (F): <i>Thymus vulgaris</i> ; (G): <i>Hyptis spicigera</i> ; (H): Eucaliptol; (I): Proprilenoglicol na concentração de 10%.....	50
Figura 5 – Percentual de amostras inibidas de isolados clínicos de <i>Lactobacillus</i> spp. pela concentração inibitória mínima. Valores expressos em µL/mL.....	54
Figura 6 – Percentual de amostras inibidas de isolados clínicos de <i>Lactobacillus</i> spp. pela concentração bactericida mínima. Valores expressos em µL/mL.....	54
Figura 7 – Percentual de amostras inibidas de isolados clínicos de estreptococos do grupo <i>mutans</i> pela concentração inibitória mínima. Valores expressos em µL/mL.....	55
Figura 8 – Percentual de amostras inibidas de isolados clínicos de estreptococos do grupo <i>mutans</i> pela concentração bactericida mínima. Valores expressos em µL/mL.....	56
Figura 9 - Lamínulas apresentado o biofilme de microcosmo em evidência.....	57
Figura 10 - Percentual de redução de crescimento do biofilme de	58

microcosmo após tratamentos realizados.....	
Figura 11 - Fragmentos de dentes imersos na solução de tratamento.....	59
Figura 12 - Percentual de inibição de adesão do biofilme ao esmalte dentário em presença dos óleos essenciais.....	61
Figura 13 - Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> . UA, unidades arbitrárias.....	65
Figura 14 - Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial de <i>Hyptis spicigera</i> . UA, unidades arbitrárias.....	66
Figura 15 - Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> . UA, unidades arbitrárias.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média aritmética dos halos de inibição (expressos em mm) dos óleos essenciais frente aos microrganismos avaliados. Concentração 10% em propilenoglicol	49
Tabela 2 - Valores de Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos óleos essenciais frente a cepas-padrão. Valores expressos em µL/mL.	51
Tabela 3 - Valores de Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM) dos óleos essenciais frente a cepas-padrão. Valores expressos em µL/mL.....	52
Tabela 4 - Valores de CIM em diferentes concentrações	57
Tabela 5 - Contagem de células bacterianas aderidas às lamínulas, expressos em UFC/mL, após tratamento do biofilme de microcosmo com os óleos essenciais.....	58
Tabela 6 - Valores de ½ CIM para os óleos essenciais.....	59
Tabela 7 - Valores de UFC/mL apresentados nos espécimes de esmalte dentário.....	60
Tabela 8 - Composição química do óleo essencial do <i>C. citratus</i>	62
Tabela 9 - Composição química dos óleos essenciais de <i>T. vulgaris</i> ..	62
Tabela 10 - Composição química do óleo essencial de <i>H. spicigera</i>	63
Tabela 11 - Percentual de inibição de adesão do biofilme ao esmalte dentário.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% = por cento

ATCC = *American Type Culture Collection*

BHI = *Brain heart infusion* (infusão cérebro coração)

CIM = Concentração inibitória mínima

CMM = Concentração microbicida mínima

CO₂ = gás carbônico

°C = grau Celsius

L = litro

h = hora

mg = miligrama

mL = mililitro

mg/mL = miligrama por mililitro

min = minuto

mm = milímetros

MSBS = *Mitis salivarius* bacitracina sacarose

NaCl = cloreto de sódio

PBS = Solução fisiológica tampão fosfato

UFC/mL = Unidades formadoras de colônias por mililitro

µL = microlitro

µg = micrograma

seg = segundos

spp. = espécies

WHO = World Health Organization

Oliveira MAC. Investigação das propriedades anticariogênicas de óleos essenciais: atividade antimicrobiana, e caracterização química [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2012.

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar os óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Hyptis spicigera*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* bem como os terpenos (cital e cineoli), com relação ao seu potencial para aplicação em terapia anticariogênica. Inicialmente, e a seguir foram realizados testes microbiológicos para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM), utilizando os micro-organismos *Actinomyces naeslundii* ATCC 19039, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Streptococcus gordonii* ATCC 10558, *Streptococcus mitis* ATCC 9811, *Streptococcus mutans* ATCC 35688, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556 e *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478, além de isolados clínicos de estreptococos do grupo mutans e *Lactobacillus* spp., ambos isolados de dentina cariada. Os três óleos essenciais com maior atividade antibacteriana foram selecionados e caracterizados quimicamente por cromatografia gasosa e avaliados frente ao biofilme de microcosmo, analisando a influência dos óleos essenciais na adesão de micro-organismo cariogênicos ao esmalte dentário. Além disso, foi analisada a capacidade de eliminação do biofilme de microcosmo sobre a lamínula de vidro. Os resultados revelaram a ação bactericida e bacteriostática de todos os óleos essenciais testados frente às cepas padrão e clínica, com CIMs variando de 0,78 a 3,125 µl /mL. Para os terpenos os valores de CIM variaram de 3,125 to 50 µl/mL. No teste de adesão, os resultados apresentam 100% de inibição da adesão do microcosmo em esmalte dentário. Este resultado também foi observado no estudo frente ao biofilme. Diante disso, conclui-se que todos os óleos essenciais e os terpenóides testados possuem atividade promissora frente micro-organismos cariogênicos, além disso, os óleos essenciais de *T. vulgaris*, *H. spicigera* e *C. citratus*, foram capazes de impedir a adesão de micro-organismos bucais ao esmalte dentário.

Palavras-chaves: Cárie dentária. Óleos essenciais. Terpenóides.

Oliveira MAC. Investigation of the anti-cariogenic properties of essential oils: antimicrobial activity, and chemical characterization [dissertation]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP-Univ Estadual Paulista; 2012.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the essential oils of Thymus vulgaris, Hyptis spicigera, Cymbopogon citratus, Cymbopogon martinii, Cymbopogon flexuosus, as well as the terpenes (citral and cineole), regarding their potential for application in anti-cariogenic therapy. The antimicrobial activity was determined by minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) for the following microorganisms: Actinomyces naeslundii ATCC 19039, Lactobacillus acidophilus ATCC 4356, Streptococcus gordonii ATCC 10558, S. mitis ATCC 9811, S. mutans ATCC 35688, S. sanguinis ATCC 10556 and S. sobrinus ATCC 33478, addition of clinical isolates of mutans streptococci and Lactobacillus sp., both isolated from carious dentin. The three essential oils with higher antibacterial activity were selected and chemically characterized by gas chromatography and evaluated against the biofilm microcosm, analyzing the influence of essential oils on the adhesion of cariogenic micro-organism to dental enamel. Furthermore, we analyzed the capacity of eliminating biofilm microcosm on glass coverslips. The results showed bactericidal and bacteriostatic action of all essential oils tested against standard and clinical strains, with MICs ranging from 0.78 to 3.125 μ l / ml. Terpenes for the MIC values ranging from 3.125 to 50 μ l / ml. In the adhesion test, the results showed 100% inhibition of the adhesion of tooth enamel in microcosm. This result was also observed when biofilm was evaluated. Therefore, it is concluded that all essential oils and terpenoids tested show promising activity against cariogenic microorganisms, mainly the essential oils of T. vulgaris, H. spicigera and C. citratus, were able to prevent the adhesion of oral microorganisms in dental enamel.

Keywords: Dental caries. Oils volatile. Terpenes.

1 INTRODUÇÃO

O impacto de produtos naturais sobre doenças infecciosas humanas tem merecido muito interesse nas últimas décadas (Leitão et al., 2004; Takarada et al., 2004), pois plantas produzem naturalmente substâncias em resposta a fatores ambientais ou químicos, como invasão microbiana ou radiação ultravioleta (Grayer, Harborne, 1994; Martini et al., 2004).

Óleos e extratos de plantas há muito tempo tem servido de base para diversas aplicações na medicina popular, entre elas, a produção de anti-sépticos tópicos. Isto serviu de base para diversas investigações científicas, com vistas à confirmação da atividade antimicrobiana (Arweiler et al., 2000; Fine et al., 2000; Pan et al., 2000; Claffey, 2003; Benkeblia, 2004; Rehder et al., 2004; Almeida et al., 2006; Arruda et al., 2006; Nunes et al., 2006).

Esse interesse nas terapias naturais e o crescimento da demanda de consumo por produtos naturais efetivos e seguros requerem estudos conclusivos sobre a ação dos óleos e extratos de plantas, para uma utilização eficiente. (Lis-Bachin, Deans, 1997; De-Souza et al., 2006; Oliveira et al., 2006a; Oliveira et al., 2006b).

A microbiota oral desempenha um papel importante no surgimento das doenças bucais, permitindo a colonização de vários micro-organismos, podendo constituir um reservatório de micro-organismos patogênicos.

Devido ao caráter infecto-contagioso da cárie dentária, a adoção de medidas que visam controlar o biofilme microbiano bucal se torna necessária, além da remoção mecânica, e o uso de agentes antimicrobianos (Kohler et al., 1995).

A cárie dentária é uma doença multifatorial de origem infecciosa e que constitui um dos maiores desafios da Odontologia, sendo considerada o maior problema de saúde bucal em muitos países industrializados. Segundo a Organização Mundial da Saúde, afetando 60-90% das crianças em idade escolar e a grande maioria dos adultos (WHO, 2010). Os principais gêneros relacionados com a cárie são *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Actinomyces* spp..

Espécies de estreptococos do grupo mitis, como *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis* (Kawamura et al., 1995) são conhecidos pelo seu papel de colonizadores primários da superfície dentária (Ericson, Rundegren, 1983; Rosan, Lamont, 2000). Essas espécies interagem com a película adquirida (formação inicial do biofilme) e modificam o ambiente, facilitando a adesão posterior de outras espécies bacterianas.

Uma dieta rica em sacarose favorece a adesão de estreptococos do grupo mutans, como *S. mutans* e *S. sobrinus*. Esses micro-organismos são capazes de metabolizar a sacarose em ácido láctico (van Houte, 1980; de Soet et al., 2000; Rupf et al., 2006). O ambiente ácido criado por esse processo leva à desmineralização do esmalte e, conseqüentemente, ao aparecimento de lesões de cárie. Com a progressão da lesão, *Lactobacillus* sp. também podem ser observados (Thomas et al., 2008). Além dessas espécies, bactérias do gênero *Actinomyces* estão associadas à cárie radicular (Bowden et al., 1997).

A clorexidina é uma das mais efetivas substâncias com atividade anti-biofilme, pois apresenta forte absorção pelas superfícies bucais, podendo reduzir o crescimento e/ou modificar a estrutura do biofilme dental, ou ainda agir como um potente antiaderente dos micro-organismos a superfície dental. (Vinholis et al., 1996). Embora seja um excelente antimicrobiano, o uso prolongado da clorexidina não é recomendado, pois pode modificar coloração dos dentes, descamação reversível da mucosa, alterações do paladar e aumento dos depósitos

calcificados supra gengivais. Por isso, há a necessidade de se buscar novas substâncias que sejam eficazes no controle da microbiota bucal, mas com menos efeitos indesejáveis (Albuquerque et al., 2008; Torres et al., 2000).

Diante disto, há um interesse crescente em agentes terapêuticos que complementam a remoção mecânica de biofilme dentário (Albuquerque et al., 2008). Produtos oriundos de plantas utilizados na prática odontológica têm mostrado resultados efetivos sobre o controle da formação de biofilme dentário, podendo interferir na síntese de polissacarídeos e enzimas que produzem estas substâncias ou ainda sobre a estrutura dentária (Santos et al., 2010).

Na busca por novos antimicrobianos é importante enfatizar aqueles de origem vegetal, uma vez que o Brasil apresenta a maior biodiversidade do planeta e que muitas plantas já vêm sendo vastamente usadas e testadas há centenas de anos com as mais diversas finalidades por populações do mundo inteiro (Stangarlin et al., 1999; Funari, Ferro 2005).

Apesar de relatos na literatura quanto a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, dados conclusivos sobre a atividade frente a micro-organismos cariogênicos e anti-biofilme dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Hyptis spicigera*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon martinii* e *Cymbopogon flexuosus*, e os terpenos (cital e cineoli) não são encontrados na literatura. O estudo das aplicações dos fitoterápicos no combate às doenças bucais é de extrema importância para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas em Odontologia, as quais poderão beneficiar diretamente a população.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos microbiológicos da cárie

A cárie dentária é uma doença multifatorial de origem infecciosa, resultado de um desequilíbrio entre os processos de desmineralização e remineralização. A cavidade bucal representa a mais complexa e diversa concentração microbiana do corpo humano em contato com o ambiente externo. Diversas comunidades microbianas são encontradas na superfície dentária, sulco gengival e mucosas (Samaranayake, 2006). Estima-se que nela habitem mais de mil diferentes espécies microbianas, cada uma delas representadas por uma grande variedade de cepas (Beighton et al., 2004).

O papel das bactérias na patogênese da cárie dentária foi demonstrado quando McClure e Hewitt (1946) compararam ratos alimentados com dieta cariogênica, e estes quando também tratados com penicilina, tinham o desenvolvimento de cárie reduzido. Orland et al. (1954) comprovaram a necessidade da presença de micro-organismos para o desenvolvimento de cáries, em um estudo utilizando ratos livres de micro-organismos (*germ free*), que não desenvolviam lesões cariosas independente do teor de açúcar presente na dieta comparando com ratos contaminados (não *germ free*) que receberam a mesma dieta desenvolvendo cárie. Em 1960, Keyes demonstrou a transmissibilidade de micro-organismos cariogênicos, comparando a microbiota de hamsters contaminados para um grupo de hamsters não contaminados.

A complexidade da cárie foi inicialmente descrita por Keyes (1960), que dividiu os fatores etiológicos em três fatores,

denominado “Tríade de Keyes” onde ocorre a confluência entre eles: hospedeiro susceptível, microbiota e substrato. Mais tarde, Newbrun (1988) acrescentou à tríade o fator tempo. A cárie caracteriza-se então por um desequilíbrio, consequência da alta concentração de ácidos orgânicos provenientes da metabolização de carboidratos por micro-organismos presentes na cavidade bucal (van Houte, 1980).

Diversas teorias etiológicas surgiram e tiveram implicações importantes para a prevenção da cárie. A teoria da placa inespecífica, proposta por Miller em 1890 defendia que todos os micro-organismos capazes de produzir ácido causariam lesões de cárie.

Durante muitos anos, pesquisadores tentaram demonstrar que somente poucas espécies específicas estavam ativamente envolvidas na patologia da cárie dentária (Loesche, 1992). Entretanto, a teoria da placa específica estabelece que grupos específicos de micro-organismos são os responsáveis pelo aparecimento da doença (Loesche, 1986). Dentro deste conceito, *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Actinomyces* spp. surgiram como as principais gêneros responsáveis pelo aparecimento de lesões cariosas (Corby et al., 2005). Sendo então a responsabilidade pela iniciação e progressão da cárie atribuída, respectivamente a *Streptococcus mutans* e a *Lactobacillus acidophilus*, devido a suas propriedades acidogênicas e acidúricas (Loesche, 1986). Contudo, a diversidade da microflora bucal humana pode ser subestimada (Keijser et al., 2008).

Em 1994, Marsh propôs a teoria da placa ecológica, que atribui a cárie a uma quebra na homeostasia da microbiota bucal induzida pela presença de carboidratos, favorecendo a predominância de bactérias cariogênicas, uma vez que somente algumas espécies são capazes de se desenvolver frente a mudanças nas condições ambientais. A teoria da placa ecológica suporta os achados dos estudos de Aas et al. (2005) em que a microbiota da cavidade bucal em condições saudáveis difere daquela associada à doença. *Streptococcus* do grupo mutans, *Lactobacillus* spp. e

Actinomyces spp. estão intimamente associados ao aparecimento de lesões de cárie. Os estreptococos do grupo mutans são considerados os principais agentes etiológicos da cárie em humanos.

Streptococcus gordonii, *S. sanguinis* e *S. mitis* são os primeiros colonizadores do biofilme bucal, associados aos micro-organismos produtores de ácidos, como *S. mutans*, participam da formação da cárie (Diaz et al., 2006, Bowden, 1997), enquanto lactobacilos estão envolvidos na progressão da cárie (Okada et al. 2005, Rodrigues et al, 2008, Kneist et al, 2010) e *Actinomyces* spp. estão relacionados com cárie radicular. Outros colonizadores primários incluem *Capnocytophaga* spp., *Eikenella* spp., *Haemophilus* spp., *Prevotella* spp., *Propionibacterium* spp., e *Veillonella* spp. (Kolenbrander, 2000). Os colonizadores secundários se aderem às bactérias previamente aderidas a superfície dos dentes. (Hojo et al, 2009).

Os estreptococos do grupo mutans são cocos Gram-positivos, anaeróbicos facultativos, acidogênicos e acidúricos capazes de formar polissacarídeos extracelulares. Esse grupo é composto por *S. cricetus*, *S. downei*, *S. ferus*, *S. macacae*, *S. rattus*, *S. mutans* e *S. sobrinus*, sendo os dois últimos isolados de superfícies dentárias e lesões de cárie em seres humanos. As demais espécies do grupo *mutans* são encontradas na cavidade bucal de animais (Leites et al., 2006). Esses estreptococos são altamente cariogênicos devido a sua capacidade de colonizar superfícies duras, pois possuem adesinas que permitem a adesão à superfície dos dentes e a outros micro-organismos encontradas no biofilme (Jakubovics et al., 2005).

Os lactobacilos são bastonetes Gram-positivos que crescem melhor em condições de microaerofilia, são produtores de ácido láctico e muito tolerantes a condições ácidas (Rogosa et al., 1951, Badet et al., 2001). Sabe-se, atualmente, que esses micro-organismos estão envolvidos na progressão da cárie (Beighton et al., 2004).

Lactobacillus spp. são micro-organismos prevalentes em lesões avançadas de cárie (Munson et al., 2004; Lima et al., 2011), sendo *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. fermentum* e *L. plantarum* as espécies predominantes em amostras de dentina cariada (Martin et al., 2002).

Actinomyces spp. são bastonetes Gram-positivos que fazem parte da microbiota bucal (Beighton, Miller, 1977; Dent, Marsh, 1981). Dentre as espécies associadas à cárie radicular estão *A. israelii*, *A. gerencseriae*, *A. naeslundii*, *A. odontolyticus* e *A. georgiae* (Brailsford et al., 1999; Preza et al., 2009). Esses micro-organismos podem colonizar a cavidade bucal sob uma variedade de condições associadas à dieta, porém são menos acidogênicos que *S. mutans* (Yang et al., 2006, Horiuchi et al., 2009). A presença de fímbrias torna esse micro-organismo capaz de liga-se a proteínas salivares ricas em prolina que cobrem a superfície do esmalte (Nesbitt et al., 1992).

As espécies do gênero *Actinomyces* são detectadas com maior frequência na fase inicial da cárie (Aas et al., 2008). Sarkonen et al. (2000) observaram que a frequência desse micro-organismo na saliva aumenta de acordo com a idade das crianças, o que sugere que a superfície dos dentes apresenta um ambiente ideal para a adesão inicial desses micro-organismos (Tang et al. 2004).

Uma teoria mais recente é a de que a placa dentária deve ser considerada um biofilme, com propriedades semelhantes àsquelas bactérias embebidas em uma matriz e aderidas a uma superfície encontradas em outros locais do corpo e da natureza (Costerton et al., 1995; ten Cate, 2006). Os micro-organismos e seus metabólitos se aderem fortemente à superfície dental dando origem a uma comunidade microbiana metabolicamente integrada, espacialmente organizada em uma estrutura tridimensional, formada por uma matriz aderente de exopolímero produzido pelas próprias células bacterianas (Beighton et al., 2004; Marinho, Araújo, 2007).

Além de desenvolver sobre a sobre as superfícies dos dentes, o biofilme pode se desenvolver sobre as restaurações dentárias, próteses e implantes, consistindo em bactérias incorporadas em uma matriz extracelular, corroborando com a hipótese da placa ecológica, onde se pode alterar sua composição através do consumo frequente de carboidratos fermentáveis (Cheng et al., 2011).

Segundo Carranza e Newman (1996), o processo de formação do biofilme dentário pode ser dividido em três fases. Na primeira fase, ocorre a formação da película dental, representando a fase inicial, que é caracterizada como uma camada proteica acelular composta de uma variedade de moléculas do hospedeiro, incluindo mucinas, aglutininas, proteínas ricas em prolina, proteínas ricas em fosfato como a estaterina e enzimas como a α -amilase, derivada de componentes salivares e do fluido gengival (Kolenbrander et al., 2002). Na segunda fase, ocorre a colonização inicial das superfícies dentárias, predominantemente por micro-organismos facultativos Gram-positivos. Essa placa amadurece e ocorre uma transição do ambiente aeróbico para um meio altamente privado de oxigênio, onde prevalecerão as bactérias Gram-negativas anaeróbias. Na terceira fase, ocorre a colonização secundária e a maturação da placa, onde micro-organismos que não iniciaram a colonização das superfícies limpas dos dentes aderem a células de bactérias que já estão na massa da placa, através de um processo conhecido como co-agregação.

Takahashi e Nyvad (2008) recentemente propuseram uma extensão à Hipótese da Cárie Ecológica para explicar a relação à composição do biofilme dentário e o balanço de desmineralização e remineralização do processo carioso. Nessa hipótese, os autores dividem o processo da cárie em três estágios: estágio da estabilidade dinâmica, estágio acidogênico e estágio acidúrico. No estágio da estabilidade dinâmica, observa-se uma predominância de estreptococos não-mutans (*S. sanguinis*, *S. oralis* e *S. mitis*) e *Actinomyces* spp. no biofilme dentário.

Essas bactérias provocam uma queda no pH do biofilme devido à produção de ácidos, o pH retorna facilmente aos níveis basais (em torno de 5,5). Esse ciclo é considerado natural e ocorre durante várias vezes ao dia. Se a presença de açúcar é freqüente, os estreptococos não-mutans e *Actinomyces* sp.alteram sua acidogenicidade e aciduricidade através de adaptações fenotípicas e genotípicas. Esse é o estágio acidogênico, no qual o biofilme se torna mais cariogênico e poderá ser observado um aumento da perda mineral em detrimento da remineralização cujo resultado final será a desmineralização do esmalte.

S. mutans e *S. sobrinus* sintetizam glicosiltransferase, uma enzima capaz de formar polímeros intra e extracelulares a partir de açúcar, outro fator importante para a capacidade desses micro-organismos em formar biofilme (Jakubovics et al., 2005). Tais micro-organismos são capazes de fermentar nutrientes da dieta resultando na produção de ácido, responsável pela desmineralização do esmalte dentário (Kohler et al., 1995). *S. mutans*, particularmente, é capaz de sobreviver, proliferar e produzir grande quantidade de ácido mesmo em pH baixo (de Soet et al., 2000).

S. mutans é mais prevalente que *S. sobrinus* no biofilme dentário (Loesche, 1986; Carlsson et al., 1987), mas estudos epidemiológicos tem demonstrado que a prevalência de *S. sobrinus* está mais intimamente relacionada com alta atividade de cárie (Fujiwara et al., 1991; Hirose et al., 1993). *A. naeslundii* contribui para o desenvolvimento do biofilme dental e para a formação da cárie radicular precoce de acordo com estudos de Tang et al. (2003) e Tang et al.(2004).

Quando a remoção do biofilme é deficiente e a utilização da sacarose é freqüente, ocorre uma seleção de certo micro-organismos patogênicos e o biofilme torna-se mais virulento, podendo resultar tanto em lesões de tecido duro quanto de tecido mole (Torres et al., 2000). Poucas horas após a escovação dos dentes, os estreptococos podem constituir 60 a 80% do biofilme dental.

Alguns estudos mostram níveis não detectáveis de *S. mutans* em lesões cariosas, indicando que outras espécies podem exercer papel importante na progressão das cáries (Aas et al., 2008; Becker et al., 2002; de Carvalho et al., 2006). Por outro lado, Bowden (1997) afirmaram que altos níveis de estreptococos do grupo mutans podem estar presentes em pacientes que não desenvolveram lesões de cárie.

Apesar da existência de evidências epidemiológicas substanciais que ligam esses três grupos de micro-organismos à cárie, estudos moleculares indicam que sua biopatologia envolve comunidades bacterianas mais complexas.

Embora existam diversos estudos sobre os componentes microbiológicos da cárie dentária, esta doença apresenta-se ainda como um problema de saúde bucal em muitos países. Portanto ainda é necessária a busca por métodos capazes de controlar a cariogenicidade do biofilme dentário e conseqüentemente, diminuir a incidência dessa doença.

2.2 Uso de plantas medicinais na Odontologia

O Brasil é o país com a maior biodiversidade de plantas do mundo, contando com um número estimado de mais de 20% do número total de espécies do planeta com cerca de 55 mil espécies já foram descritas. Esta rica biodiversidade é acompanhada por uma longa aceitação de uso de plantas medicinais e associado ao conhecimento tradicional. Por todo o mundo, o uso de produtos naturais, incluindo plantas medicinais e óleos essenciais estão se tornando cada vez mais importante nos cuidados primários com a saúde, especialmente em países em desenvolvimento onde grande parte da população ainda

depende da medicina popular para tratar doenças sérias, como câncer, infecções e inflamações (Mothana et al., 2009).

Essa crescente procura por plantas medicinais e aromáticas observada em diversos países deve à tendência dos consumidores em utilizarem, preferencialmente produtos farmacêuticos ou alimentícios de origem natural (Martini et al., 2004). Além disso, tecnologias naturais de conservação vêm se tornando cada vez mais importantes em indústrias de alimentos e os óleos essenciais constituem alternativas à obtenção de produtos microbiologicamente seguros (Ultee et al., 1999).

Atualmente, aproximadamente 48% dos medicamentos empregados na terapêutica advêm, direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas medicinais que permanecem uma importante fonte para obtenção de medicamentos (Carvalho et al., 2007).

Reduções significativas na incidência e prevalência de lesões de cárie nos últimos 20 anos ocorreram pela introdução do uso do flúor, porém a distribuição de cárie se concentrou em uma parte da população, criando grupos de indivíduos com muitas lesões de cárie, frequentemente associados com baixo nível sócio-econômico (ten Cate, 2006). Assim, embora o uso do fluoreto seja uma medida eficaz no controle da cárie dentária, muitas vezes ele não é capaz de lidar com inibir o desenvolvimento cariogênico (ten Cate, 2006). Deste modo, reduzir a quantidade e virulência do biofilme dentário poderia ter uma ação sinérgica com o uso do fluoreto (ten Cate, 2006). Além disso, terapias antimicrobianas efetivas poderiam aumentar o número de produtos disponíveis para sua prevenção e melhorar a condição bucal de pacientes quando somente o uso do fluoreto não é o suficiente (Ullsfooss et al., 1994).

A grande maioria dos colutórios e antimicrobianos disponíveis no mercado, particularmente aqueles que possuem clorexidina em sua composição, possui desvantagens sérias quando

utilizados por longos períodos de tempo, como manchamento dos dentes, perda de paladar, ardor e sensação de queimação (Cardoso et al., 2005; Bruschi et al., 2006). Devido ao uso limitado da clorexidina, a busca de alternativas mais eficazes, menos tóxicas e menos onerosas na prevenção de cáries se torna necessária. Diante disso, esforços consideráveis estão dedicados ao desenvolvimento de produtos naturais bioativos (ten Cate, 2006).

O interesse pela descoberta de novos produtos úteis no tratamento das doenças infecciosas sustenta-se no surgimento de novos agentes infecciosos, na resistência que muitos micro-organismos apresentam aos agentes terapêuticos existentes (Karchmer, 2004; Paterson, 2006) e na diminuição do número de novos fármacos antimicrobianos que chegaram ao mercado nos últimos anos (Spellberg et al., 2004). Apesar do desenvolvimento de antibióticos para infecções bacterianas e fúngicas, há uma necessidade urgente de desenvolver novos agentes antimicrobianos (Naimi et al., 2001) , devido à presença e aumento de numerosas cepas resistentes aos medicamentos disponíveis.

Na odontologia, muitos estudos estão sendo conduzidos na busca por produtos naturais capazes de controlar a microbiota causadora de doenças bucais (Riihinen et al., 2011; Pereira et al., 2011). Entretanto a maioria das pesquisas para testar agentes antimicrobianos é realizada com células planctônicas, sendo que as características do biofilme são consideravelmente mais resistentes aos tratamentos que células planctônicas (ten Cate, 2006). O potencial antimicrobiano das plantas pode ser utilizado na Odontologia com ação profilática ou curativa das doenças bucais.

Uma série de plantas medicinais tem sido mencionada nos manuais de fitoterapia para tratar doenças infecciosas diferentes, conforme sua disponibilidade, menos efeitos colaterais e toxicidade reduzida (Lee et al., 2006).

2.3 Óleos essenciais e seu uso na Odontologia

Óleos essenciais ou óleos voláteis , conforme a ISO 9235:1997 (International Standard Organization), são produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos pelo processamento mecânico dos pericarpos de frutos cítricos. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, normalmente odoríferas e líquidas. A grande maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo estes preponderantes. (Simões, 2004). Portanto, são misturas complexas de substâncias voláteis oriundos de metabólitos secundários, principalmente de mono e sesquiterpenos, (Salzer, 1977; Angioni et al., 2003. Senatore et al., 2004). Os óleos essenciais podem estar constituídos por mais de 60 componentes individuais, sendo que os componentes principais podem compreender, aproximadamente, até 85% do óleo essencial (Senatore, 1996).

Uma característica importante dos óleos essenciais e seus constituintes é a sua hidrofobicidade, o que lhes permite a quebra de lípideos da membrana celular bacteriana, o que perturbaria as estruturas, tornando-os mais permeáveis (Sikkema et al., 1995). O efeito antimicrobiano dos óleos essenciais está relacionado, principalmente, à alteração da permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana (Lambert et al., 2001).

Segundo Kelsey et al. (1984), alguns táxons de plantas sintetizam constituintes voláteis com a finalidade de defenderem-se ou de atrair os polinizadores. Por isso, os óleos essenciais são considerados fontes em potencial de substâncias biologicamente ativas, principalmente contra micro-organismos, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras.

Óleos essenciais de diversas plantas são conhecidos por ter uma variedade de efeitos farmacológicos, destacando os seguintes: antiviral, antiespasmódico, analgésico, antimicrobiano, cicatrizante, expectorante, relaxante, anti-séptico das vias respiratórias, larvicida, vermífugo e anti-inflamatório (Halcon, Milkus, 2004; Oyedji, Afolayan, 2006). Diante disso, tem sido apresentando como potente inibidor do crescimento dos micro-organismos orais, podendo ser uma opção benéfica e segura em protocolos de saúde bucal (Bispo et al., 2001; Alviano et al., 2005), apresentando atividade antimicrobiana contra um grande número de micro-organismos incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos (Soares, Cury, 2001, Simões et al., 2004).

Em particular, a atividade antimicrobiana de óleos vegetais e extratos tem formado a base de muitas aplicações, incluindo a conservação de alimentos crus e processados, produtos farmacêuticos, medicina alternativa e terapia naturais (Lis-Balchin, Deans 1997).

Diversos estudos tem demonstrado a atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos de plantas, incluindo alecrim, hortelã, louro, manjerição, a árvore do chá, sementes de aipo e funcho (Yousef,Tawil 1980; Lis-Balchin, Deans, 1997). Porém, a composição química de óleos essenciais pode depender do clima, da estação do ano, condições geográficas, período de colheita e da técnica empregada na extração incluindo maceração, destilação, dentre outras (Santos et al., 2010) sendo que os princípios ativos podem estar presentes em diferentes frações de um mesmo produto.(Carvalho, 2003).

Tampieri et al. (2005) relataram a atividade antifúngica de diversos óleos essenciais como: *Origanum vulgare*, *Satureja montana*, *Mentha piperita*, *Cinnamomum verum* e *Cymbopogon flexuosus* frente a *candida albicans* O óleo essencial de *Origanum vulgare* inibiu 100% cepas de *Candida* spp. analisadas (Rosato et al., 2009).Em outro estudo , Oliva et al. (2003) concluiu que óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e seus componentes principais apresentaram atividade frente a várias

espécies de *Candida* e seu terpeno principal (terpinen-4-ol) também foi capaz de controlar infecções vaginais por esse mesmo micro-organismo. Além disso, *M. alternifolia*, segundo Furneri et al., 2006, é capaz de inibir o crescimento de *Mycoplasma pneumoniae* e *M. hominis* in vitro, em concentrações de 0,01% a 0,12%, entretanto os mecanismos de ação não foram esclarecidos.

Também são relatadas a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum*, *Coniza bonariensis* frente a micro-organismos oportunistas incluindo *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans*. Hoffman et al. (1999) apresentaram a ação antimicrobiana de óleos essenciais de canela, menta e cravo, do qual inibiram o crescimento de leveduras e bactérias testadas.

De acordo com Silva et al., 2007, o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* possui atividade bacteriostática frente a *S. mutans*, *S. sobrinus* e *L. casei* (Silva et al., 2007). Também são relatadas a atividade bacteriostática do óleo essencial de *Baccharis dracurufolia* frente a *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. sanguis* e *Lactobacillus casei* (Ferronato et al., 2007).

2.3.1 *Hyptis spicigera*

O gênero *Hyptis* apresenta diversidade morfológica e é encontrado no Cerrado brasileiro, com cerca de 300 a 400 espécies registradas, segundo Harley (1988). Esse gênero pertence à família Lamiaceae, uma vasta família com cerca de 250 gêneros e 6970 espécies (Judd et al., 1999), de distribuição cosmopolita, mas centrada, principalmente, na região mediterrânea, onde constitui parte integrante da vegetação (Bordignon et al., 1990).

Muitos dos usos populares de espécies de *Hyptis* puderam ser comprovados cientificamente. Baseado nos artigos

publicados na literatura pode-se perceber que as espécies desse gênero se caracterizam pela presença de substâncias com potencial farmacológico bastante interessante, principalmente atividades antimicrobiana, antifúngica, citotóxica, anti-inflamatória, e inseticida (Falcão et al., 2003). Atualmente, é consenso que elas são eficazes no tratamento de infecções gastrointestinais, câimbras, dores e infecções da pele.

Na medicina popular, esta planta é recomendada para várias condições, entre elas rinofaringite, congestão nasal, certas doenças da pele, distúrbios gástricos, febre e infecções bacterianas (Bispo et al., 2001).

Nascimento et al. (2008) demonstrou em um estudo com o óleo essencial de *H. pectinata* a ação antimicrobiana contra cepas de *Streptococcus mutans* através do método de microdiluição. Os resultados das MICs encontrados com as cepas clínicas foram semelhantes aos da cepa de referência. Além disso, os autores consideraram a associação de *Hyptis pectinata* com clorexidina uma alternativa promissora para controle de doenças bucais e higiene. Diante disso *H. pectinata* também tem sido amplamente utilizado como enxaguatórios bucais pela população no Estado de Sergipe, Brasil.

A espécie *Hyptis spicigera*, trata-se de uma erva daninha e aromática, uma espécie de hortelã, diferente da comumente usada para fazer chás e infusões. Tem como característica peculiar a inflorescência, que a diferencia das demais espécies de *Hyptis*.

O potencial antimicrobiano do extrato de *H. spicigera* foi avaliado contra um amplo espectro de micro-organismos que são resistentes a ampicilina. Os resultados indicam *H. spicigera* como um forte potencial de agentes antimicrobianos. Devido à notável importância econômica e o potencial farmacológico dos óleos essenciais de espécies do gênero *Hyptis* (Falcão, Menezes, 2003) mais trabalhos precisam ser

realizados para verificar o componente ativo do extrato envolvidos nos mecanismos bactericidas (Ladan et al., 2009).

2.3.2 *Thymus vulgaris*

O óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho) tem sido usado na formulação de fitoterápicos e cosméticos, além de seu uso na indústria alimentícia. Na medicina ocidental, a aplicação principal está no tratamento de queixas digestivas, de problemas respiratórios e na prevenção e no tratamento de infecções (Santos et al., 2010).

Santos et al. (2010) verificou que o óleo essencial de *T. vulgaris* (tomilho) apresenta efeito antibacteriano frente a *S. mutans* (ATCC 25175) com CIM de 100 µg/mL., relacionando a atividade biológica aos seus principais constituintes, timol, carvacrol, cimeno e pineno.

Pozzatti et al. (2010) encontraram na composição do óleo de tomilho composto por 64% γ-terpinene, timol (21 %), o-cimene (14%) e α-pineno (1%) Bruneton, 1999 relata a composição de timol, cariofileno, germacreno, pineno, canfora, eucaliptol O óleo essencial apresentou atividade antifúngica frente diversas cepas de *Candida* spp. em CIMs variando de 400-3200 µg/ml. Hammer et al. (2003) relataram a atividade do tomilho contra *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli* apresentando a concentração inibitória mínima de 0,03% (v/v) para os micro-organismos citados.

2.3.3 Gênero *Cymbopogon*

O gênero *Cymbopogon*, família Poaceae, possui mais de 100 espécies nos países tropicais, inclusive no Brasil, dentre as quais,

aproximadamente 56 são aromáticas. Este gênero é conhecido por fornecer óleo essencial rico em citral (Ming et al.,1996). Dentro do gênero *Cymbopogon* spp. podemos destacar as espécies *C. citratus*, *C. flexuosus* e *C. martinii*.

C. martinii é um óleo essencial de importância comercial. Conhecido comercialmente como óleo de palmarosa tem a sua ação antimicrobiana atribuída principalmente ao seu teor de geraniol. Os componentes majoritário do *C. martinii* major constituintes do óleo são acetato, geranil geranilo, citronelal e linalol (Hussain et al., 1992).. A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. martinii* já foi relatada nos estudos de Gangrade et al.(1990) apresentando atividade bacteriostática e bactericida e Anita e Katewa (2001), onde este apresentou atividade antifúngica.

Outro representante desse gênero refere-se ao *C. flexuosus*, comercialmente conhecido como lemongrass e popularmente como capim-limão da Índia Oriental (May et al., 2008). Tem sua atividade antimicrobiana e anti-biofilme relada no estudo de Adukwu et al.(2012), frente a diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*. Foi avaliada também frente a a *Candida* spp.,possuindo atividade antifúngica.

C. citratus é conhecido popularmente no Brasil como capim-limão (Castro, Ramos, 2003).Esse nome lhe foi atribuído devido à semelhança com o aroma de limão. É uma erva perene, ereta, de 0,60 a 2m de altura, com folhas aromáticas, estreitas, longas e paralelinérveas (Castro, Ramos, 2003) Suas folhas são consumidas pela população na forma de chá ou infusão há muito tempo. O seu principal emprego está relacionado no alívio de pequenas cólicas uterinas e intestinais, má digestão, flatulência, no tratamento de insônia, estresse, além de efeito antitérmico, antiespasmódico e diurético (Cortez et al., 1999).

Seus princípios ativos têm uso comprovado: o citral tem efeito antifúngico (fungicida e fungioestático), pesticida, inseticida, antibacteriano (bactericida e bacterioestático), anti-séptico. O geraniol, o

citronelol e o mirceno possuem ação anti-séptica, fungicida, insetífuga, pesticida. Os efeitos da cânfora e do canfeno são atribuídos às funções insetífungas e pesticidas. O geraniol possui atividade fungicida, inseticida, larvicida, vermífugo, antioxidante, anti-séptico (Craveiro et al., 1981; Teske, Trentini, 1995).

A atividade antimicrobiana de *C. citratus* foi relatada na literatura. Entretanto, são poucos os trabalhos existentes em relação à sua ação antimicrobiana contra micro-organismos cariogênicos. Contudo, relata-se que pequenas concentrações do óleo essencial promovem excelentes efeitos em cepas de distintas espécies microbianas.

Em outro estudo Schuck et al. (2001) avaliaram a atividade antibacteriana e antifúngica do óleo volátil, extratos aquosos e hidroetanólico de *Cymbopogon citratus* frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Os resultados obtidos demonstraram que o óleo volátil apresentou atividade contra todos os micro-organismos testados, em especial frente a *C. albicans*.

Silva et al. (2008) também relataram a ação antifúngica do óleo essencial das folhas frescas de *C. citratus* sobre cepas hospitalares de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Foram relatadas também atividade fungicida frente a *Saccharomyces cerevisiae* Helal et al. (2006), além de apresentarem atividade de inibição e alongação de hifas de espécies de *Thichophyton sp.* (Inouye et al., 2001)

2.3.4 Citral

Citral é um dos principais componentes do óleo essencial de *C. citratus*. Apresentando aproximadamente 65-85% de sua composição. O nome citral é o nome dado a uma mistura natural de dois

isômeros acíclicos aldeídos monoterpêicos: geranial (trans-citral, citral A) e neral (cis-citral, citral B) (Onawunmi, 1989).

Craveiro et al. (1981) avaliando a composição química do óleo essencial dessa planta, identificou que os compostos citral (mistura isomérica de neral e citral) são majoritários e responsáveis pelo aroma cítrico da planta (Sacchetti et al., 2005; Silva et al., 2008) além de demonstrarem a atividade antimicrobiana do citral sobre cepas de *Candida* spp., apresentando excelentes resultados.

2.3.5 Eucaliptol (1,8 cineole)

Eucaliptol é um terpeno presente em diversos óleos essenciais. Quimicamente é conhecido como 1,8 cineole. Hendry et al. (2009) em estudo, verificaram atividade antimicrobiana do eucaliptol contra uma grande variedade de micro-organismos planctônicos e de biofilme, verificando a atividade antimicrobiana desse terpeno. Em outro estudo, Karpanen et al. (2008) demonstraram a atividade antimicrobiana deste terpeno frente a *S. epidermidis* em suspensões e biofilme.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos desse trabalho foram:

- a) Avaliar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Hyptis spicigera*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus*, e os terpenos citral e cineole frente a micro-organismos colonizadores primários e cariogênicos;
- b) Avaliar a atividade anti-biofilme dos 3 óleos essenciais com maior atividade bactericida e bacteriostática;
- c) Caracterizar quimicamente por CG/EM os 3 óleos essenciais com maior atividade antibacteriana.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aprovação no Comitê de Ética com Seres Humanos

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FOSJC - UNESP, estando de acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa com seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, sob protocolo nº 096/2011-PH/CEP (ANEXO A).

4.2 Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de *Hyptis spicigera*, *Cymbopogon citratus*, foram adquiridos da Laszlo Aromaterapia Ltda. (Belo Horizonte, MG). Os óleos de *Cymbopogon flexuosus*, *Cymbopogon martinii* e *Thymus vulgaris* foram adquiridos comercialmente da empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda (Vargem Grande Paulista - SP, Brasil) , o terpeno citral foi adquirido na empresa BASF Química (Guaratinguetá, SP, Brasil) e o terpeno eucaliptol foi adquirido da empresa Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

4.5 Cepas de referências e condições de crescimento

As seguintes cepas de referência foram utilizadas neste estudo: *Actinomyces naeslundii* ATCC 19039, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Streptococcus gordonii* ATCC 10558, *S. mitis* ATCC 9811, *S. mutans* ATCC 35688, *S. sanguinis* ATCC 10556 e *S. sobrinus* ATCC 33478. Essas culturas foram mantidas congeladas em Brain Heart Infusion (BHI) e glicerol.

Culturas de 24 a 72 h desses micro-organismos foram utilizadas para obtenção de uma suspensão contendo 10^7 UFC/mL em solução salina esterilizada (NaCl 0,9%) por espectrofotometria. Todas as incubações foram realizadas a 37°C em 5% CO₂, exceto para *L. acidophilus*, que foi incubado em aerobiose e *A. naeslundii* que foi incubado em anaerobiose. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

4.6 Amostras clínicas

Foram incluídas nesse estudo 12 isolados clínicos de estreptococos do grupo mutans, e 20 isolados clínicos de *Lactobacillus* spp. ambos isolados da dentina cariada.

Culturas de 48 h desses micro-organismos foram utilizadas para obtenção de uma suspensão contendo 10^7 UFC/mL em solução salina esterilizada (NaCl 0,9%) por escala de Mac Farland. Todas as incubações foram realizadas a 37°C em 5% CO₂, exceto para *L. acidophilus*, que foi incubado em aerobiose. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

4.5 Coleta de dentina cariada

A coleta de dentina infectada, em forma de slices, foi realizada na Clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP. Os pais/responsáveis pelos pacientes foram informados sobre os objetivos do estudo e aqueles que aceitaram em participar assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Foram coletadas 10 amostras de dentina cariada de molares de crianças distintas com dentição decídua completa, com idade de 05 a 11 anos. A coleta foi realizada com auxílio de uma cureta esterilizada, sendo que uma pequena amostra de dentina cariada foi retirada e imediatamente transferida para um tubo contendo 1 mL de solução fisiológica tamponada (PBS, pH 7,0). Em seguida, as amostras de dentina, foram submetidas por 10 min de vibração em banho ultrassônico.

As amostras foram diluídas em série decimal de 10^{-1} a 10^{-4} em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%). Para o cultivo de estreptococos do grupo mutans, alíquotas de 100 μ L de cada diluição foram inoculadas, em duplicata, em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar *Mitis salivarius* acrescido de bacitracina [5mg/mL] e sacarose [15%] (MSBS). Para o cultivo de *Lactobacillus* spp. alíquotas de 100 μ L de cada diluição foram inoculadas em ágar Rogosa utilizando-se a técnica de pour-plate.

Após incubação a 37° C (5% CO₂ para grupo mutans) por 48 h, as placas que tiveram crescimento positivo foram selecionadas e duas colônias foram coletadas de cada grupo. As colônias foram selecionadas baseando-se em suas características morfológicas, verificadas através de microscopia e coloração de gram. As amostras foram congeladas a - 20° C e armazenadas em BHI-glicerol.

4.6 Teste de difusão em ágar

Nessa etapa foram avaliados os óleos essenciais ou terpenos, a fim de se verificar a atividade bacteriana. O método de difusão em poço com dupla camada de ágar foi realizado segundo metodologia adaptada por Bruschi et al. (2006). Nesse experimento foram utilizadas as cepas de referência e condições de crescimento conforme descritos no item 4.3.

Uma camada base de ágar foi obtida vertendo-se 20 mL de ágar BHI em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. A seguir, foram obtidos os inóculos contendo 10^7 UFC/mL por espectrofotometria em solução salina esterilizada (NaCl 0,9%).

Para confecção da camada *seed*, tubos contendo 10 mL de ágar BHI foram preparados e esfriados a 55°C. Um volume de 100 µL da suspensão de micro-organismos foi acrescentado ao ágar atingindo uma concentração final de 1%. Em seguida, o ágar contendo o inóculo foram acrescidos às placas de Petri contendo as camadas bases já solidificadas. Após a solidificação da camada *seed*, foram confeccionados poços no ágar utilizando canudos plásticos padronizados com 5 mm de diâmetro e esterilizados.

Nesse experimento os óleos essenciais e os terpenos foram diluídos em propilenoglicol na proporção 9:1(v/v). Em seguida, 50µL dos óleos essenciais foram pipetados nos poços.

Como controle positivo foi utilizado Periogard® (digluconato de clorexidina 0,12%) e como controle negativo foi utilizado caldo BHI.

As placas permaneceram em temperatura ambiente por 1 hora para que ocorresse a difusão dos óleos e terpenos. Em seguida as placas foram incubadas por 24 h, em condições de crescimento específica

para cada micro-organismo (descrita no item 4.3). Após esse período, os halos de inibição foram medidos.

Os testes foram realizados em duplicata e os resultados, expressos em mm pela obtenção da média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formado ao redor dos poços nas 2 repetições.

4.7 Obtenção dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

A atividade antimicrobiana foi determinada pela concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), pela técnica de microdiluição em caldo em placas de 96 poços (NCCLS,1997). A atividade antimicrobiana foi avaliada sobre cepas de referências e isolados clínicos.

Os óleos essenciais e terpenos foram diluídos em propilenoglicol na proporção 9:1 (v/v) Apenas no poço 1 da placa foi utilizado caldo BHI 2 vezes concentrado de modo que todos os nutrientes presentes no caldo, estivessem disponíveis para o crescimento dos micro-organismos. Diluições seriadas de razão 2 foram obtidas diluindo 50 µL dos óleos essenciais ou terpenos acrescidos de 50 µL de caldo BHI,,obtendo-se volume final de 100 µL.

Em seguida alíquota de 10 µL dos inóculos contendo 10^7 UFC/mL, conforme descritas anteriormente, foram adicionadas aos poços contendo os óleos. As diluições seriadas variaram de 100 a 0,19 µL/ mL da concentração inicial do óleo essencial (figura 1A).

Como controle positivo, foi utilizado Periogard® (digluconato de clorexidina 0,12%). Como controle negativo, foi utilizado caldo BHI. As placas foram incubadas por 24 h, em condições necessárias para cada micro-organismo.

A inibição do crescimento bacteriano foi avaliada após o período de incubação por meio da avaliação do meio de cultura em relação ao controle (obtenção da CIM). Além disso, a CBM foi obtida por meio da subcultura em ágar BHI e incubação por 24 h (Figura 1B).

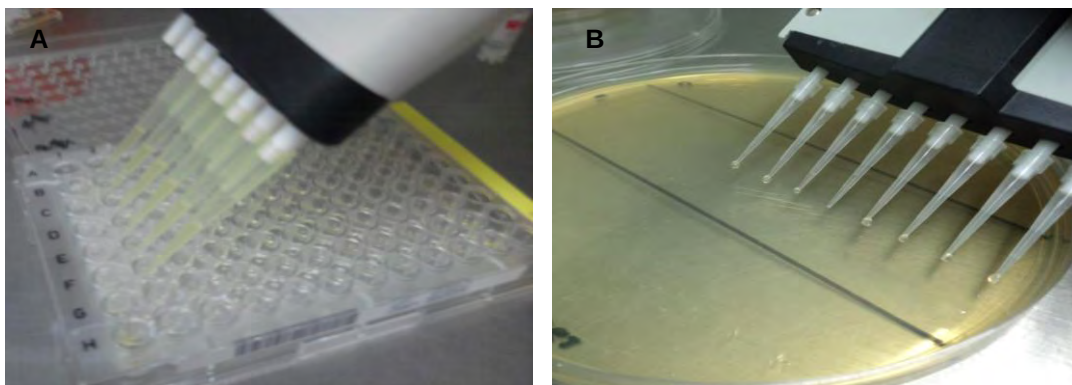


Figura 1 - (A) Diluições seriadas entre os poços. Foram transferidos 50 μ L a cada poço. (B); Subcultura de ágar BHI.

A CIM foi definida como a menor concentração na qual há 80% de inibição do crescimento. A CBM foi a menor concentração que apresentou ausência de crescimento bacteriano na subcultura.

Os 3 óleos essenciais ou terpenos que apresentaram os menores valores de CIM frente as cepas de referencias foram selecionados para os testes seguintes.

4.8 Influência do óleo essencial sobre o crescimento de biofilme em microcosmo

Nessa fase do estudo foi avaliada a ação do óleo essencial sobre a capacidade de desestruturar, reduzir ou impedir adesão do biofilme.

4.8.1 Obtenção do microcosmo de saliva

O microcosmo foi coletado de saliva humana, de acordo com Cheng et al. (2011). Para a coleta foi selecionado um adulto saudável, sem cárie ou doença periodontal e que não fez uso de antibióticos durante os três últimos meses anteriores à coleta.

No período da coleta, o doador foi orientado a não escovar os dentes durante 24 h e não ingerir alimentos ou líquidos por 2 h antes do procedimento. Em frasco coletor estéril, foram coletados 20 mL de saliva, sendo a coleta estimulada com Paraplast[®] (filme plástico parafinado) e mantida em gelo, durante o procedimento de coleta.

A saliva coletada foi filtrada utilizando compressas de gazes, afim de remover resíduos sólidos e então foram diluídas em glicerol estéril, 7:3 (v/v). A mistura saliva-glicerol foi armazenada a -6°C em alíquotas de 2 mL.

4.8.2 Condições de crescimento do Biofilme

Os biofilmes foram formados em lamínulas de vidro circulares, medindo 18 mm, que foram acopladas em um suporte metálico (figura 2), ficando suspensas em placa de cultura de células de 24 poços.

A cada poço foi adicionado 1,5 mL de meio de caldo BHI enriquecido com 0,2% de sacarose. Em seguida foram adicionados 30 µL do concentrado microcosmo/glicerol. As lamínulas foram incubadas por 48 h a 37°C em anaerobiose, ficando sob agitação em uma mesa agitadora orbital a 80 rpm. O meio de cultura foi trocado após 8 h e 24 h do período inicial de incubação, para manutenção somente das células aderidas até o final do teste (figura 2A e figura 2B).

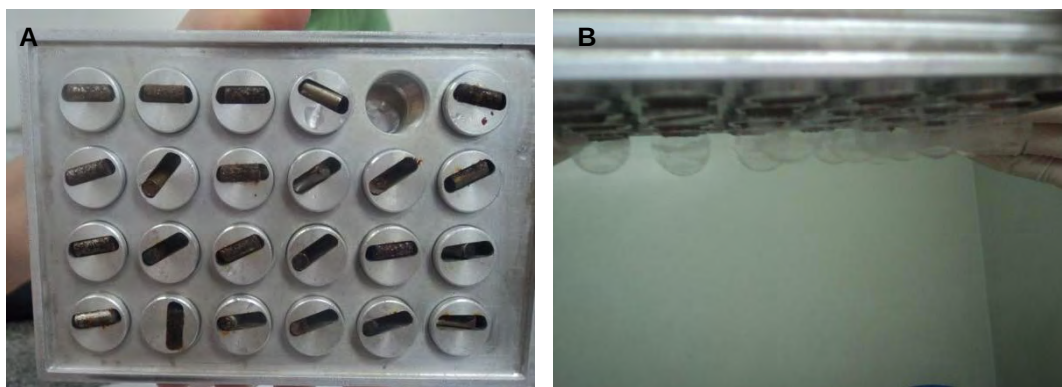


Figura 2 - (A) Suporte metálico utilizado para acoplar as lamínulas; (B) Lamínulas de vidro no suporte que foi inserido em placa de 24 poços.

4.8.3 Tratamento do biofilme formado

Após o período de incubação as lamínulas contendo biofilme foram imersas nas soluções de tratamento (óleos essenciais) em concentrações de 2, 4 e 10 vezes a CIM obtida no item 4.7 onde permaneceram por 60 min.

Após o tratamento as lamínulas foram mergulhadas em água destilada para retirada do excesso de óleo essencial e transferidas para solução fisiológica (NaCl 0,9%) a fim de eliminar micro-organismos não aderidos. A seguir, estas lamínulas foram transferidas para tubos contendo 4 mL de solução fisiológica e agitadas por 1 min. Em seguida, foram sonicadas (Misonix Inc., NY, EUA) por 45 segundos, respeitando-se uma pausa a cada 10 segundos (amplitude 50 e potência 15 watts).

A suspensão resultante foi submetida à diluição seriada 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , e inoculada em ágar BHI para contagem de micro-organismos totais.

Como controle positivo, foi utilizado Periogard® (digluconato de clorexidina 0,12%). Como controle negativo, foi utilizado caldo BHI e propilenoglicol.

As placas foram incubadas por 24 h a 37°C em 5% CO₂. Os experimentos foram realizados em duplicata e o resultado expresso em termos de valores de UFC/mL.

4.9 Efeito do óleo essencial sobre a adesão inicial de micro-organismos do microcosmo ao esmalte dentário

4.9.1 Obtenção dos fragmentos de dentes

Os dentes utilizados no estudo foram provenientes da Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, extraídos de pacientes atendidos no ambulatório da referida clínica, por motivos periodontais e/ou protéticos, e que foram descartados após a extração. Os dentes foram autoclavados e, em seguida, raspados para a remoção de placa bacteriana, cálculo dental ou outras substâncias que pudessem interferir no experimento. Com auxílio de um micromotor associado ao disco de carborundum e ponta diamantada, foram obtidos fragmentos de dentes. Em seguida, os fragmentos de dentes foram padronizadas em áreas de 2 x 2 mm com esmalte estético (Risqué, São Paulo, SP, Brasil) (figura 3A e figura 3B). Esses fragmentos foram esterilizados por radiação gama cobalto 60 (25 kGy/6h; IPEN-CNEN/SP, São Paulo, SP, Brasil).

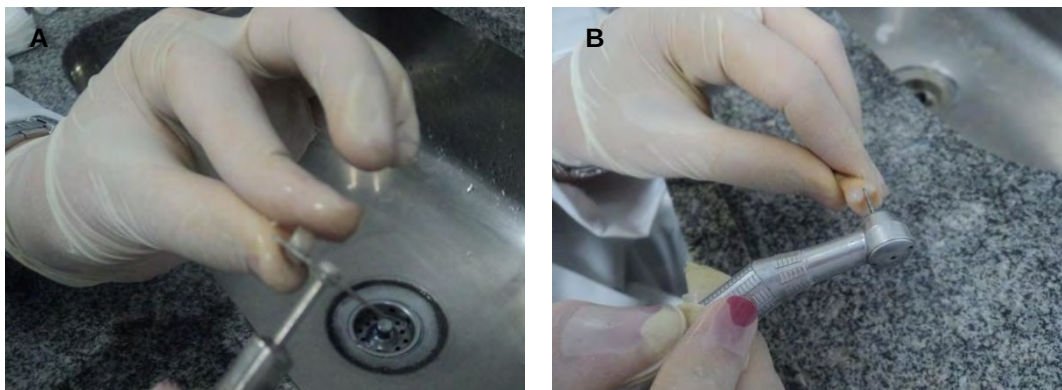


Figura 3 - (A) Corte inicial de dentes, utilizando disco de carburundum; (B) Corte sequencial dos fragmentos, utilizando ponta diamantada.

4.9.2 Tratamento do biofilme de microcosmo em esmalte dentário

A obtenção do microcosmo e as condições de crescimento do biofilme foram descritas no item 4.8.1.e 4.8.2.

Os fragmentos de dente foram inseridos em poços da placa de 96 poços contendo 75 μ L de caldo BHI acrescidos de 75 μ L da concentração sub-CIM (1/2) do óleo essencial e 3 μ L do concentrado microcosmo/glicerol. Os fragmentos de dente foram incubados por 24 horas em anaerobiose, estando sob agitação a 80 rpm. Após incubação, os fragmentos de dente foram transferidos para tubos contendo 2 ml de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e agitadas por 1 min. Em seguida, foram sonicados por 45 seg. obtendo-se uma pausa a cada 10 seg. (amplitude 50 e potência 15 watts).

A partir das suspensões obtidas foram preparadas diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}), que foram semeadas em duplicata em placa de ágar BHI para contagem total de micro-organismos.

As placas foram incubadas por 24 h a 37°C em 5% CO₂. O grupo controle negativo não foi submetido ao tratamento e o controle positivo, foi tratado com Digluconato de clorexidina 0,12%. Além disso, foi

incluído um grupo controle propilenoglicol. Nesse experimento foram utilizados 15 espécimes de dentes e os resultados foram expressos em termos de valores de UFC/mL.

4.10 Análise do perfil químico dos óleos essenciais mais ativos

Esta fase foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Marcos José Salvador, do Curso de Farmácia da Universidade Estadual de Campinas (IB/UNICAMP).

A identificação dos componentes químicos das amostras dos óleos essenciais foi feita por cromatografia gasosa acoplada a detector de massas (CG-EM, Shimadzu GC-2010), seguindo metodologia descrita por Pascoal et al. (2011). Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida como fase estacionária (DB-5; 5,30 m x 0,32 mm x 0,25 µm). Temperatura de injetor 250°C; razão de split 1:30; detector com temperatura de 250°C; hélio como gás de arraste (1,52 mL/min, White Martins, 99,9%); volume injetado 1 µL de amostra diluída em clorofórmio (1:100). O aquecimento da coluna foi programado para 60° (3 min) - 220°C (5 min) a 3°C/min, com tempo total de corrida de 40 min. O espectro de massa foi de 40 a 600 u.m.a.

Os constituintes dos óleos foram identificados por comparação de seus espectros de massas com aqueles da biblioteca do sistema CG-EM (NIST 62 lib), com a literatura, bem como, por comparação do índice de retenção de Kovats. O índice de Kovats foi calculado através da equação de Kovats, utilizando-se uma solução padrão de hidrocarbonetos (C₈ a C₂₀). As análises foram realizadas em triplicata.

5 RESULTADOS

5.1 Testes de difusão em ágar

Os resultados apresentados na tabela 1 demonstram que os óleos essenciais e terpenos analisados sugerem ação antimicrobiana. A figura 4 apresenta um exemplo do teste realizado.

Tabela 1 - Média aritmética dos halos de inibição (expressos em mm) dos óleos essenciais frente aos microrganismos avaliados. 9:1 (v/v) em propilenoglicol

Óleos essenciais	Micro-organismos						
	<i>S. mutans</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. mitis</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>A. naeslundii</i>
<i>C. citratus</i>	11	10	10	11	19	8	16
<i>C. flexuosus</i>	10	19	9	13	24	9	17
<i>C. martinii</i>	12	14	10	15	26	9	19
Citral	10	12	10	15	20	1	16
Eucaliptol	7*	7*	7*	10*	0	0	7
<i>H. spicigera</i>	9	11	12	11	19	7	19
<i>T. vulgaris</i>	17	18	21	36	36	21	24
Clorexidina	17	20	19	24	22	13	25
Propilenoglicol	0	0	0	0	0	0	0

* Presença de microcolônias nos halos

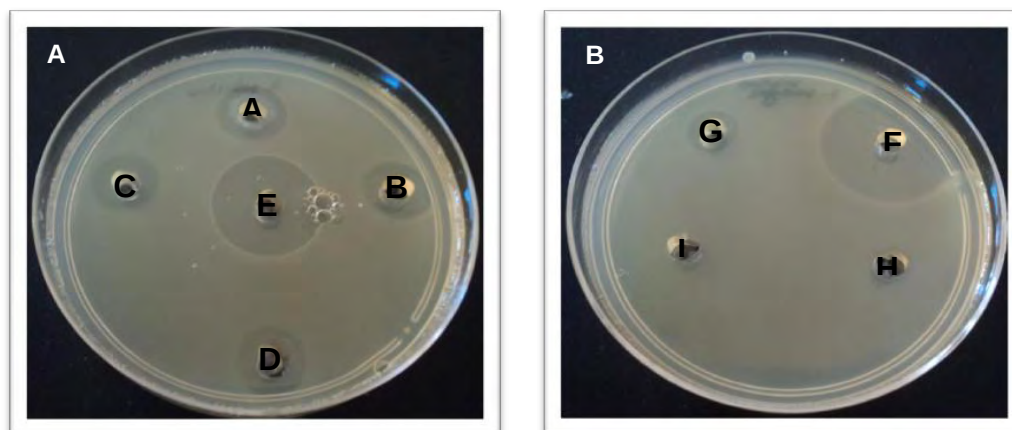


Figura 4 - Teste de difusão realizado com *Streptococcus sobrinus*: **(A)**: *Cymbopogon martinii*; **(B)**: *C. citratus*; **(C)**: *C. flexuosus*; **(D)**: Citral; **(E)**: Clorexidina; **(F)**: *Thymus vulgaris*; **(G)**: *Hyptis spicigera*; **(H)**: Eucaliptol; **(I)**: Propilenoglicol

Observa-se que para o propilenoglicol utilizado como diluente para os óleos essenciais e terpenos não foi detectado halo de inibição de nenhum dos micro-organismos (figura 4A e figura 4B).

5.2 Atividade antimicrobiana sobre cepas padrão e isolados clínicos - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos e terpenos

5.2.1 Resultados para cepas padrão

Para todos os óleos analisados, registrou-se o efeito bacteriostático e bactericida frente as cepas padrão analisadas. Nas tabelas 2 e 3 estão expressos os resultados de CIM e CBM obtidos para as cepas-padrão avaliadas. Todos os óleos essenciais apresentaram efeito bactericida. As cepas de *A. naeslundii* apresentaram-se mais sensíveis (menor valor de CIM) diante dos óleos e terpenos. Assim como

T. vulgaris apresentou a menor CIM para todos os micro-organismos estudados. Observou-se também para este óleo a menor CBM para a maioria dos micro-organismos avaliados, com exceção de *S. mutans*, onde a menor CBM foi identificada para *H. spicigera*.

Em todas as cepas avaliadas o terpeno Eucaliptol apresentou-se menos efetivo (maiores valores de CIM e CBM), sendo que frente a *L. acidophilus* não apresentou atividade antimicrobiana.

Os valores de CIMs variaram de 0,39 a 50 µL/mL e os valores de CMB (tabela 3) variaram de 1,56 a 100 µL/mL. Para o controle positivo (clorexidina) a CIM variou de 0,19 a 1,56 µL/mL, já a menor CBM foi de 0,39 µL/mL. O controle negativo (propilenoglicol) não apresentou atividade antimicrobiana frente nenhuma cepa.

Tabela 2 - Valores de Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos óleos essenciais frente a cepas-padrão. Valores expressos em µL/mL

Óleos essenciais	Micro-organismos						
	<i>S. mutans</i> ATCC 35688	<i>S. gordonii</i> ATCC 10558	<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	<i>S. mitis</i> ATCC 9811	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	<i>A. naeslundii</i> ATCC 19039
	CIM	CIM	CIM	CIM	CIM	CIM	CIM
<i>C. citratus</i>	3,1	1,5	3,1	3,1	3,1	1,5	1,5
<i>C. flexuosus</i>	3,1	3,1	6,2	6,2	3,1	3,1	3,1
<i>C. martinii</i>	12,5	6,2	6,2	3,1	3,1	1,5	1,5
Citral	3,1	6,2	3,1	3,1	6,2	1,5	1,5
Eucaliptol	25,0	50,0	25,0	12,5	12,5	*	50,0
<i>H. spicigera</i>	1,5	3,1	3,1	1,5	12,5	1,5	1,5
<i>T. vulgaris</i>	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	0,7	0,3
Clorexidina	0,3	0,7	0,3	0,1	1,5	0,3	0,1

* Não foi observado efeito bacteriostático para o terpeno Eucaliptol frente a *L. acidophilus* ATCC 43556.

Tabela 3 - Valores de Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM) dos óleos essenciais frente a cepas-padrão. Valores expressos em µL/mL

Óleos essenciais	Micro-organismos						
	<i>S. mutans</i> ATCC 35688	<i>S. gordonii</i> ATCC 10558	<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	<i>S. mitis</i> ATCC 9811	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	<i>A. naeslundii</i> ATCC 19039
	CBM	CBM	CBM	CBM	CBM	CBM	CBM
<i>C. citratus</i>	12,5	6,2	12,5	12,5	6,2	3,1	6,2
<i>C. flexuosus</i>	6,2	12,5	25,0	12,5	6,2	6,2	6,2
<i>C. martinii</i>	25,0	12,5	25,0	12,5	6,2	3,1	3,1
Citral	12,5	12,5	6,2	6,2	12,5	3,1	3,1
Eucaliptol	50,0	100,0	50,0	25,0	25,0	*	100,0
<i>H. spicigera</i>	3,1	12,5	6,2	6,2	6,2	3,1	3,1
<i>T. vulgaris</i>	6,2	6,2	3,1	3,1	3,1	1,5	3,1
Clorexidina	1,5	1,5	0,7	0,3	1,5	0,7	0,3

*:Não foi observado efeito bactericida para o terpeno Eucaliptol contra *L. acidophilus* ATCC 43556.

O óleo essencial que apresentou a menor CIM foi o *T. vulgaris*

Os óleos essenciais que apresentam os melhores resultados frente as cepas de referencia, (menores valores de CIMs e CMBs), foram selecionados para os testes posteriores.

Diante dos resultados, *T. vulgaris*, *H. spicigera* e *C. citratus* foram selecionados para os próximos estudos.

5.2.2. Resultados obtidos para os isolados clínicos

Após a seleção dos óleos essenciais mais ativos, foram determinadas as CIM e CBM para os isolados clínicos. Assim, os três

óleos selecionados para este teste foram *C. citratus*, *H. spicigera* e *T. vulgaris*.

Todos os óleos selecionados apresentaram efeito bactericida e bacteriostático perante todos os isolados clínicos de *Lactobacillus* spp. e estreptococos do grupo *mutans*.

Entre os isolados de *Lactobacillus* spp., os valores de CIMs variaram de 0,39 µl/mL a 12,5 µl/mL. Dentre as amostras testadas, 35% (n=20) das tratadas com *C. citratus* apresentaram um CIM igual à cepa padrão. Para o *H. spicigera* e o *T. vulgaris* esse valor variou de 25 a 20% respectivamente (figuras 5 e 6).

Para o *C. citratus*, 55% das amostras apresentaram-se com valores de CIMs inferior ou igual aos valores da cepa padrão. Entre os *H. spicigera* e *T. vulgaris* os valores variaram entre 40% e 35% respectivamente. Entretanto, dentre as amostras avaliadas, 15% mostraram-se mais resistentes, apresentando valores de CIMs e CMBs superiores em até 8 vezes o valor da CIM padrão.

O óleo mais efetivo frente a maior parte das amostras (70%), apresentando os menores valores de CIMs, foi o óleo essencial de *C. citratus*.

Entre os isolados clínicos de estreptococos do grupo *mutans* também foi observado para todos os óleos testados ação bactericida e bacteriostática.

Quando comparado com a cepa padrão (ATCC 35688), as cepas clínicas de estreptococos do grupo *mutans* verificou-se que no máximo 33% (n=12) que apresentaram CIM com valores iguais ou inferiores ao valor da CIM padrão (figuras 7 e 8).

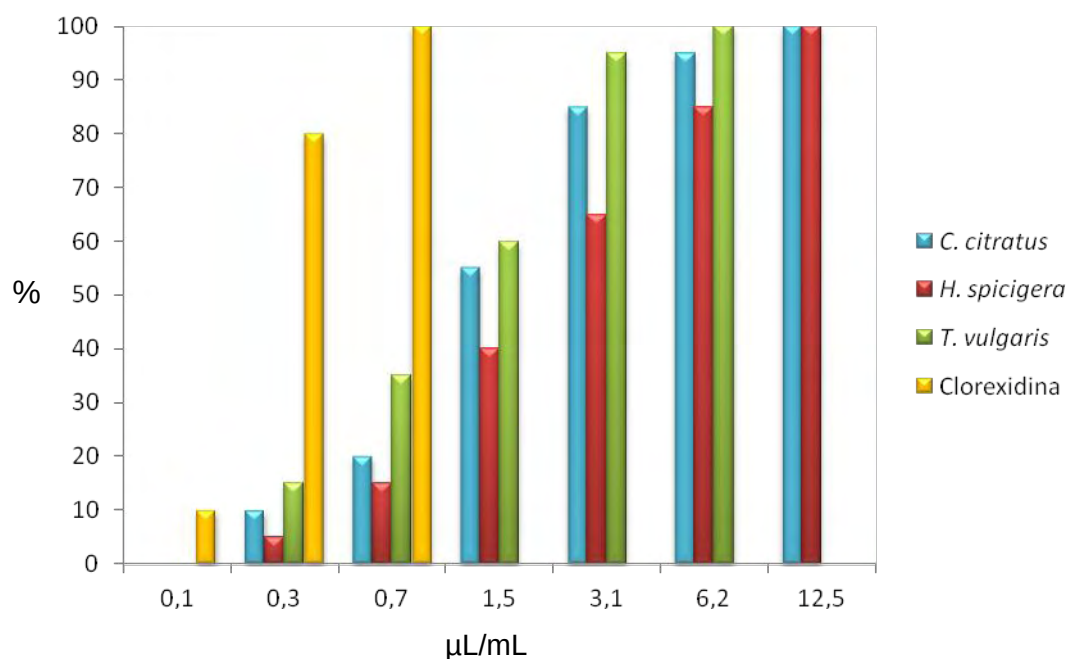


Figura 5 – Percentual de amostras inibidas de isolados clínicos de *Lactobacillus* spp. pela concentração inibitória mínima. Valores expressos em µL/mL.

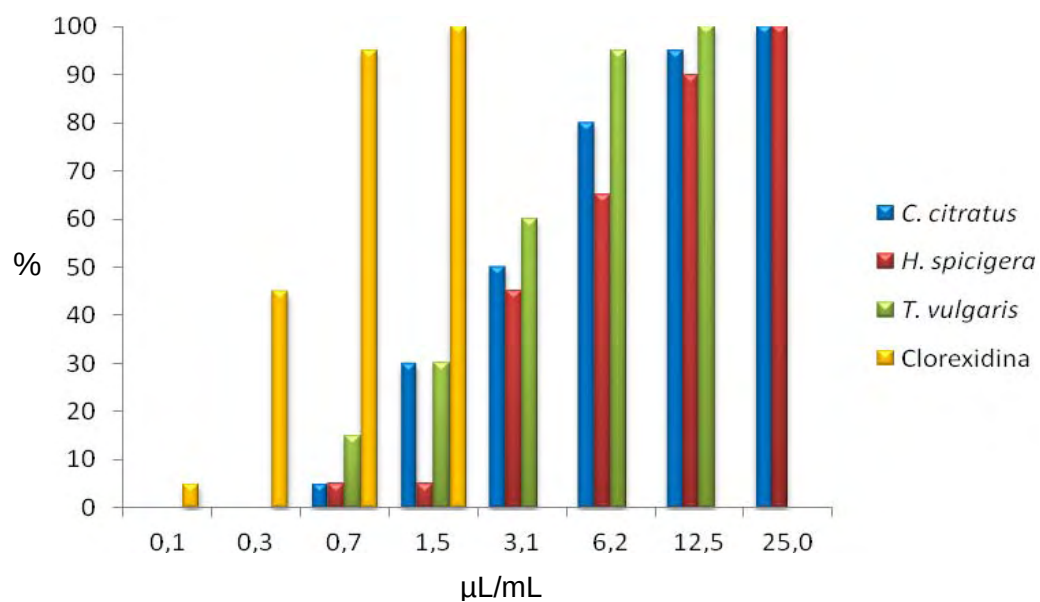


Figura 6 – Percentual de amostras inibidas de isolados clínicos de *Lactobacillus* spp. pela concentração bactericida mínima. Valores expressos em µL/mL.

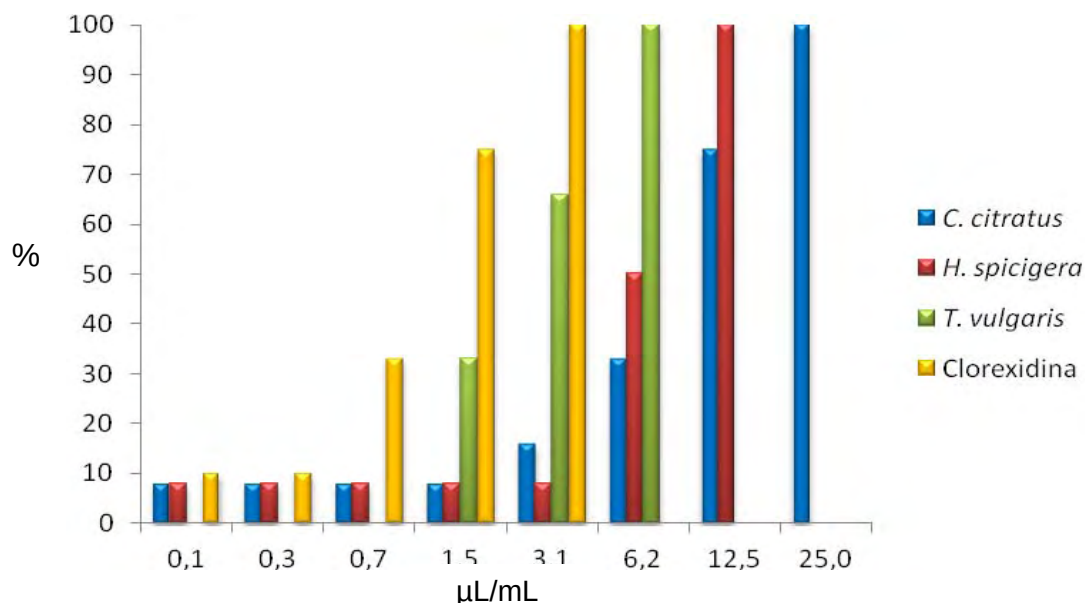


Figura 7 – Percentual de amostras inibidas de isolados clínicos de estreptococos do grupo *mutans* pela concentração inibitória mínima. Valores expressos em µL/mL.

Doze cepas de estreptococos do grupo *mutans* 2 (16%) cepas apresentaram-se mais sensíveis para *C. citratus*. Entretanto, 8 cepas (40%) apresentaram valores de CIM superiores a 4 vezes o registrado para cepa padrão.

Para *H. spicigera*, 1 cepa (8%) apresentou um valor de CIM menor que a cepa padrão. Para as cepas restantes foi avaliado um valor de CIM superior a 4 vezes o valor observado para a cepa padrão.

O óleo de *T. vulgaris* teve uma constante de 33% (4 cepas) para a CIM padrão, para CIMs 2 vezes superiores a padrão e 4 vezes superiores a padrão. O menor valor de CIM registrado foi para o óleo essencial de *T. vulgaris*.

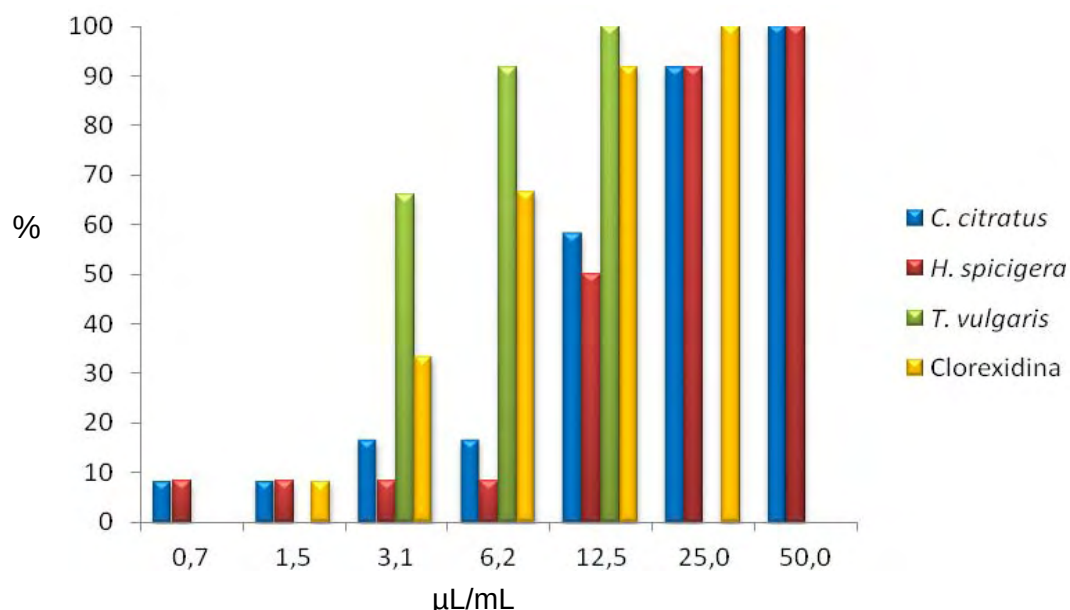


Figura 8 – Percentual de amostras inibidas de isolados clínicos de estreptococos do grupo mutans pela concentração bactericida mínima. Valores expressos em µL/mL.

5.3 Influência do óleo essencial sobre a formação de biofilme

O biofilme de microcosmo foi formado na lamínula de vidro, conforme condições de crescimento e incubação descritos anteriormente, e em seguida tratados.

As soluções de tratamento (óleos essenciais) foram obtidas conforme resultado das CIMs expressas no item 5.2.1, onde a maior CIM entre as cepas padrão avaliadas foi selecionada para este experimento.

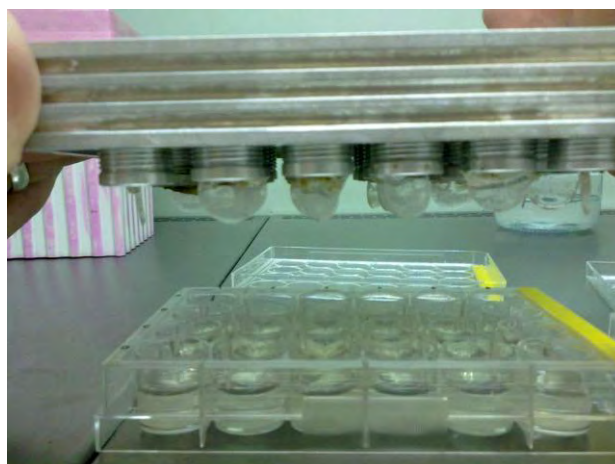


Figura 9 - Lamínulas apresentando o biofilme de microcosmo em evidência.

As lamínulas foram tratadas com concentrações de 2,4 e 10 vezes a maior CIM selecionada (tabela 4).

Tabela 4 - Valores de CIM em diferentes concentrações

Óleos essenciais	Valores de CIM			
	CIM	2X	4X	10X
<i>C. citratus</i>	3,1	6,2	12,5	31,2
<i>H. spicigera</i>	3,1	6,2	12,5	31,2
<i>T. vulgaris</i>	1,5	3,12	6,2	15,6

Valores expressos em $\mu\text{L/mL}$

O número de células aderidas por lamínula foi determinado (tabela 5).

Todos os óleos essenciais avaliados e em todas as concentrações os óleos essenciais foram capazes de inibir 100% desenvolvimento do biofilme (figura 10).

Tabela 5 - Contagem de células bacterianas aderidas às lamínulas, expressos em UFC/mL, após tratamento do biofilme de microcosmo com os óleos essenciais

Tratamento	Concentração	Contagem total UFC/mL
<i>C. citratus</i>		0
<i>H. spicigera</i>	2X	0
<i>T. vulgaris</i>		0
<i>C. citratus</i>		0
<i>H. spicigera</i>	4X	0
<i>T. vulgaris</i>		0
<i>C. citratus</i>		0
<i>H. spicigera</i>	10X	0
<i>T. vulgaris</i>		0
Clorexidina	0,12%	$1,2 \times 10^5$
Propilenoglicol	-	$1,2 \times 10^7$
Controle Negativo*	-	$1,36 \times 10^7$

*Controle negativo – não tratado

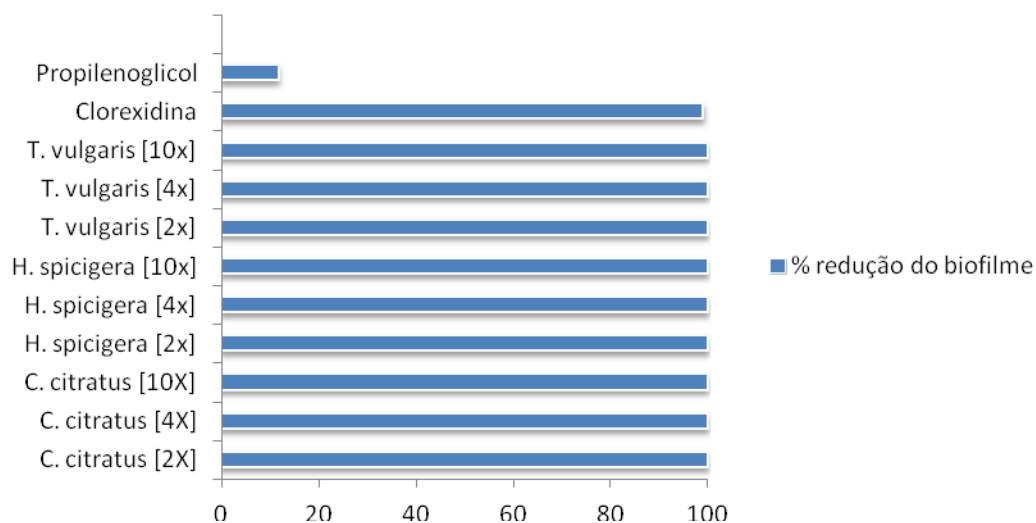


Figura 10 - Percentual de redução de crescimento do biofilme de microcosmo após tratamentos realizados.

5.4 Efeito dos óleos essenciais sobre a adesão inicial de microcosmo ao esmalte dentário.

Para os testes de adesão foram utilizados os valores de $\frac{1}{2}$ CIM dos óleos essenciais (tabela 6). A figura 11 mostra os fragmentos de dentes inseridos na solução de tratamento.

Tabela 6 - Valores de $\frac{1}{2}$ CIM para os óleos essenciais

Óleos essenciais	Valores de $\frac{1}{2}$ CIM
<i>C. citratus</i>	3,1
<i>H. spicigera</i>	0,7
<i>T. vulgaris</i>	1,5

Os valores de UFC/mL obtidos estão apresentados na tabela 7. O tratamento com os óleos essenciais reduziu significativamente os valores de UFC sobre o biofilme de microcosmos formados sobre a superfície do esmalte dentário quando comparado ao controle negativo. (figura 12).

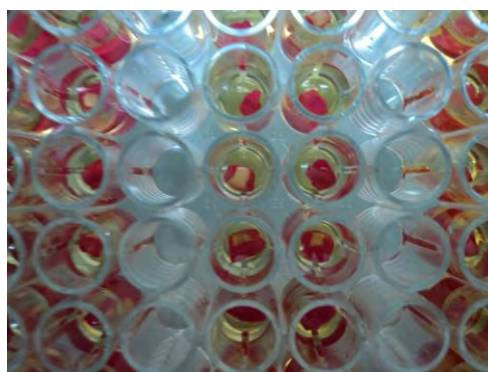


Figura 11 - Fragmentos de dentes imersos na solução de tratamento.

Tabela 7 - Valores de UFC/mL apresentados nos espécimes de esmalte dentário

Amostras	Controle	<i>C. citratus</i>	<i>H. spicigera</i>	<i>T. vulgaris</i>	Clorexidina
1	$1,45 \times 10^7$	0	0	0	$3,5 \times 10^4$
2	$5,3 \times 10^6$	0	0	2×10^2	$3,15 \times 10^4$
3	$7,5 \times 10^6$	0	0	1×10^3	0
4	5×10^5	0	0	0	$2,5 \times 10^4$
5	$7,5 \times 10^6$	0	0	0	$2,7 \times 10^9$
6	$4,2 \times 10^6$	0	0	0	2×10^5
7	$4,45 \times 10^6$	0	0	0	1×15.10^5
8	$2,25 \times 10^7$	0	0	0	$1,7 \times 10^3$
9	$2,15 \times 10^7$	0	0	0	2×10^3
10	$3,7 \times 10^7$	0	0	0	$5,9 \times 10^3$
11	$3,8 \times 10^6$	0	0	0	$3,15 \times 10^6$
12	4×10^4	0	0	0	6×10^4
13	$1,5 \times 10^6$	0	0	0	$5,2 \times 10^6$
14	5×10^5	0	0	0	3×10^5
15	$3,05 \times 10^5$	0	0	0	$4,5 \times 10^5$

Dentre as amostras estudadas, apenas 2 (n=15) apresentaram crescimento positivo após tratamento com os óleos essenciais (tabela 7).

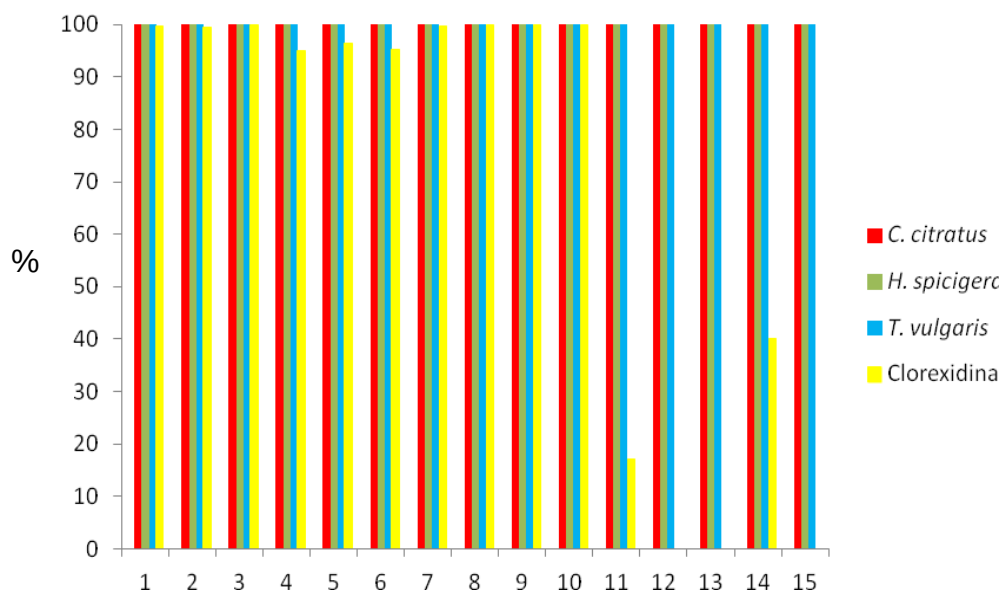


Figura 12 - Percentual de inibição de adesão do biofilme ao esmalte dentário em presença dos óleos essenciais.

5.5 Caracterização química dos óleos essenciais

A caracterização química foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM).

O terpeno α -pineno foi encontrado na composição de *T. vulgaris* e *C. citratus*. Outra substância encontrada nos diferentes óleos avaliados foi o β -mirceno, nos óleos essenciais de *H. spicigera* e *C. citratus*.

A análise por CG-EM realizada para o óleo essencial de *C. citratus* sugere que o componente majoritário desta amostra é o citral responsável por mais de 80% da composição do óleo. Na concentração de citral presente observa-se 34,14% de cis-citral e 46,61% de trans-citral (tabela 8).

Tabela 8 - Composição química do óleo essencial do *Cymbopogon citratus* por CG-EM

Substância	Composição (%)
β -mirceno	16,8
trans- β -ocimeno	0,2
Ocimeno	0,1
Nerolidol	0,8
7-metil-3,4-octadieno	0,1
citronelal	0,2
Oxido de α -pineno	0,6
cis-citral	34,1
trans- citral	46,6
Total identificado: 99,9%	

A análise do óleo de CG-EM mostrou o carvacrol como constituinte majoritário, constituindo 13,6% da amostra (tabela 9).

Tabela 9 - Composição química dos óleos essências de *Thymus vulgaris* por CG-EM

Substância	Composição (%)
α -pineno	4,82
canfeno	11,29
p-cimeno	12,6
carvacrol	13,78
timol	5,22
Total identificado: 47,7%	

Para *H. spicigera* o componente majoritário apontado foi o α -pineno com mais de 50% da constituição da amostra seguido de cineole com 20% da composição (tabela 10).

Tabela 10 - Composição química do óleo essencial de *Hyptis spicigera* por CG-EM

Substância	Composição (%)
α -tujeno	0,2
α -pineno	50,8
Sabineno	1,1
β -pineno	18,3
β -mirceno	0,1
β -felandreno	0,3
α β -cimeno	0,2
Cineole	20,3
Copaeno	0,2
β -bourboneno	0,3
Cariofileno	7,0
Humuleno	0,4
Germacreno D	0,1
Oxido de cariofileno	0,6
Total identificado 99,9%	

As figuras 13, 14 e 15 mostram os gráficos gerados nas análises cromatográficas dos óleos essenciais.

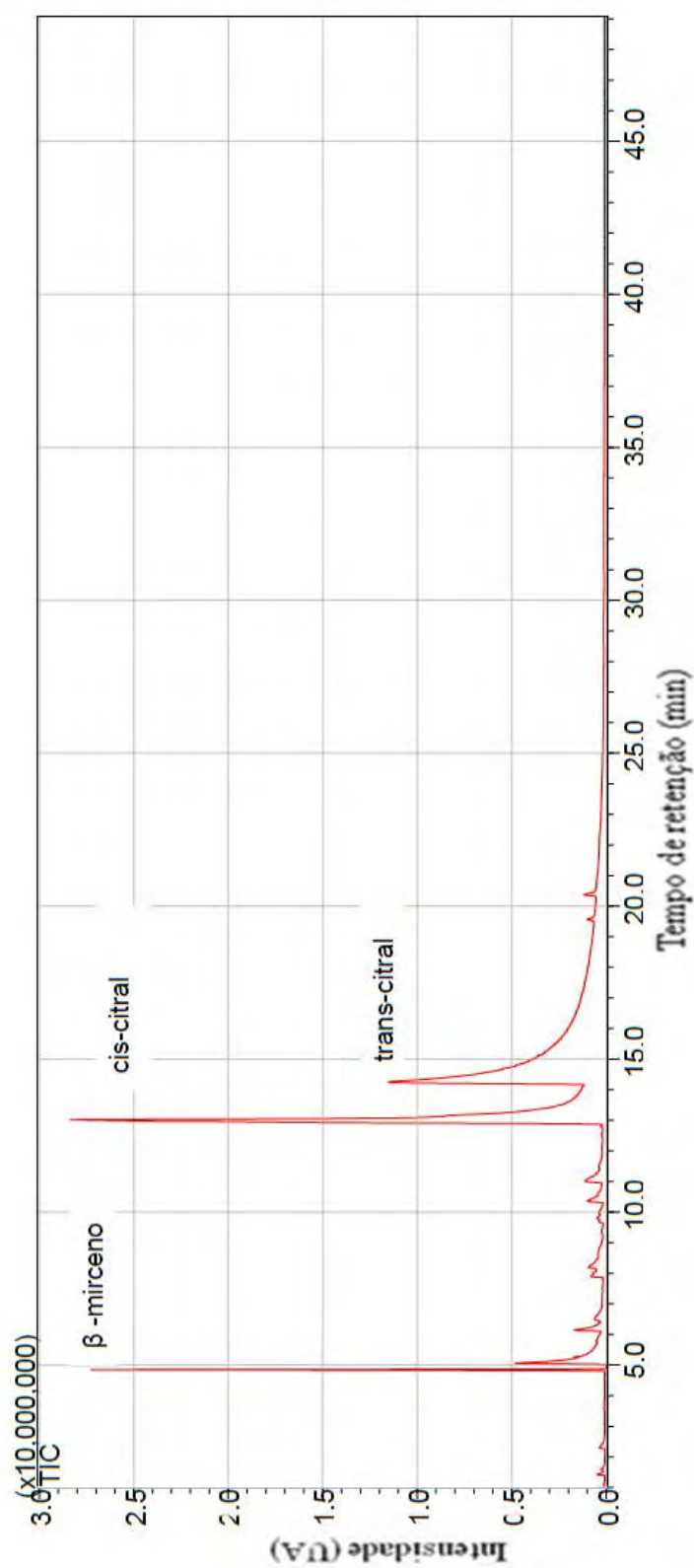


Figura 13 - Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. UA, unidades arbitrárias.

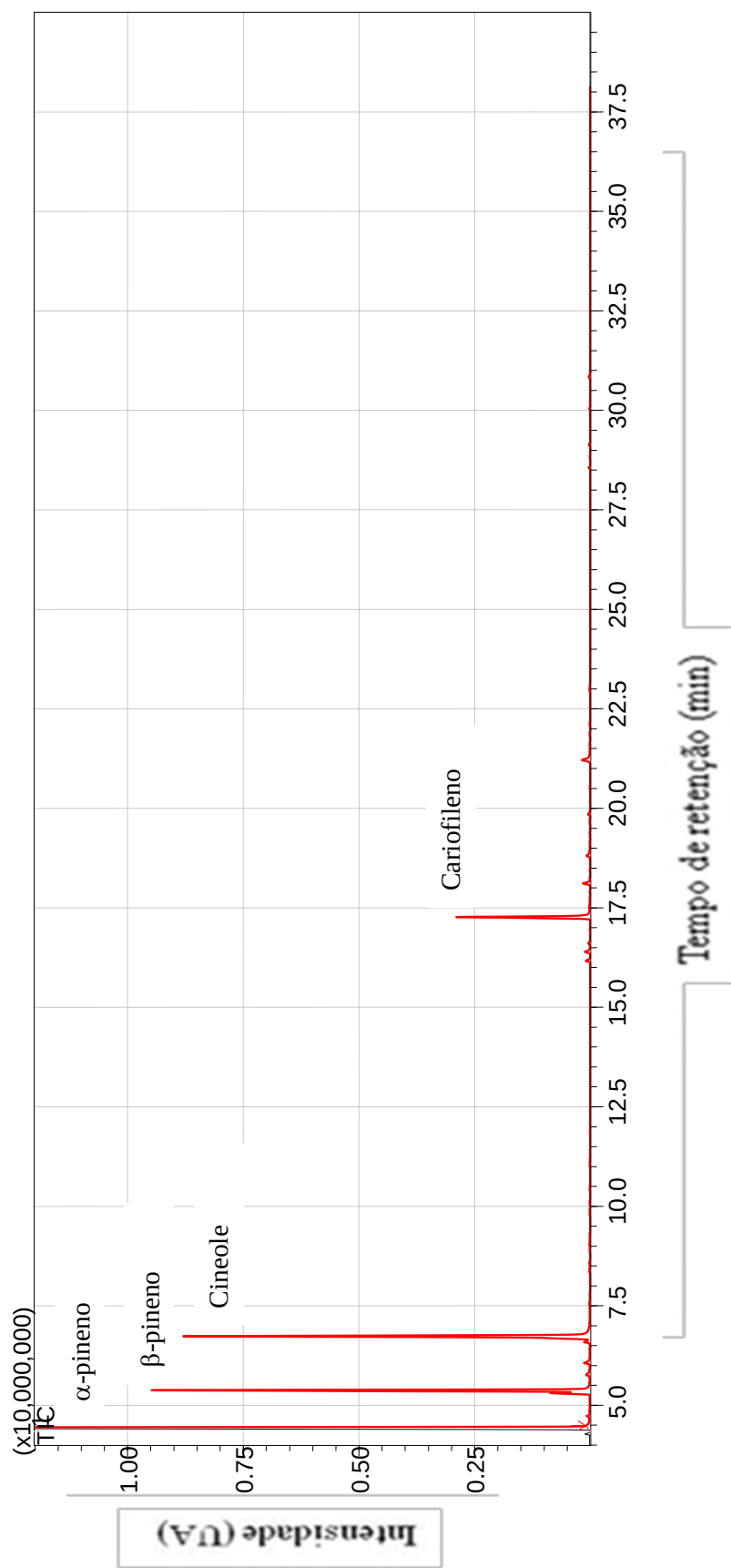


Figura 14 - Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial de *Hyptis spicigera*. UA: unidades arbitrárias.

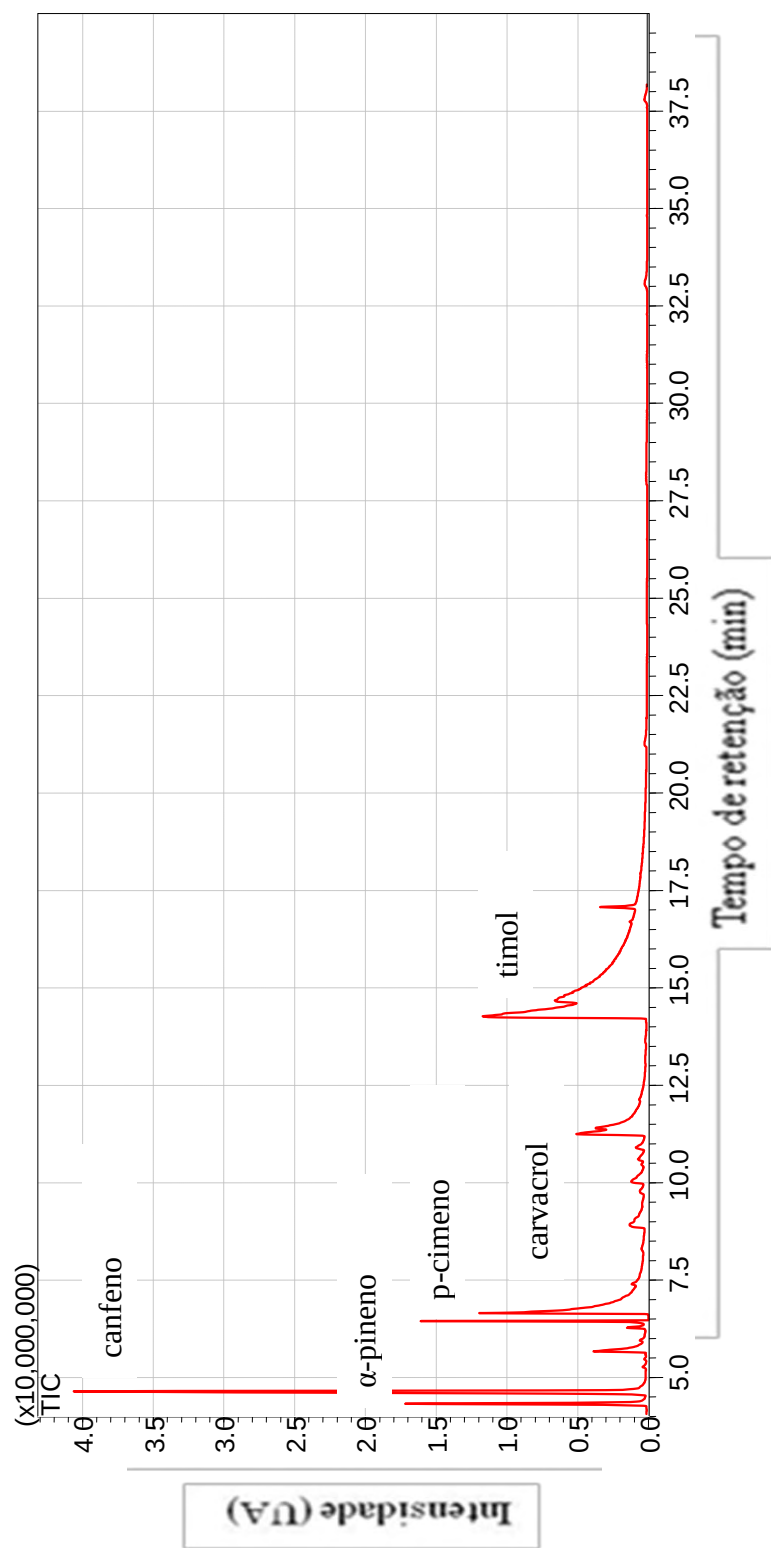


Figura 15 - Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial de *Thymus vulgaris*. UA, unidades arbitrárias.

6 DISCUSSÃO

A cárie dental apresenta-se ainda como uma das infecções bucais mais comuns, mesmo com avanços em sua redução. (Bowen et al., 2002). É uma doença causada pela interação de vários fatores: micro-organismos, hospedeiro, dieta e tempo (Selwitz et al., 2007).

Os micro-organismos presentes no biofilme são considerados um dos fatores de maior importância para o início e progressão da doença (Farsi et al., 2008) pois estes se aderem à superfície dental organizando-se funcionalmente no interior da matriz extracelular (Mah, 2001; Spratt, Pratten, 2003) e são capazes de modificar o ambiente para favorecer o seu crescimento e sobrevivência (Davey, Toole, 2000).

A grande efetividade antimicrobiana do digluconato de clorexidina trouxe grande avanço na prevenção das cáries (Jarvinen et al., 1993; Oliveira et al., 2011). Contudo, devido aos efeitos indesejáveis que causa, não é um produto indicado para uso contínuo (Twetman, 2004; Paraskevas, 2005; Gunsolley et al., 2006; Autio-Gold, 2008). Tendo em vista a constante necessidade de novas opções terapêuticas, novas formulações a base de produtos naturais vem sendo estudadas. De fato, estudos tem detectado a atividade promissora de substâncias naturais sobre micro-organismos cariogênicos. Chung et. al (2006) estudaram a ação antimicrobiana do extrato de *Myristica fragrans* contra cepas padrão de micro-organismos bucais como *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus aureus*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* e *S. salivarius*. O estudo revelou que o extrato de *M. fragrans* obteve valores de CIM e CBM mais

efetivos que a clorexidina e outros colutórios testados, demonstrando que produtos naturais tem grande potencial a ser explorado.

Neste estudo, as espécies *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. gordonii*, *S. sobrinus*, *Actinomyces naeslundii* e *Lactobacillus acidophilus* foram incluídas para avaliação da efetividade antimicrobiana de óleos essenciais. A seleção destas espécies baseou-se no fato de serem correlacionadas com o início e progressão de cárie dentária em seres humanos. *S. mutans* é considerado o principal agente etiológico da cárie dentária devido às suas características de aderência às superfícies lisas, acidogenicidade e aciduricidade (Leites et al., 2006). Este tem sido frequentemente relacionado às cáries de superfície lisa, onde a fixação bacteriana é mais difícil. No entanto, essas espécies só colonizam consistentemente a superfície dentária quando favorecidas pela presença constante de sacarose sendo responsável pela desmineralização do esmalte dentário na etapa inicial da cárie (Lorenzo, Lorenzo, 2004). Outro representante do grupo mutans, *S. sobrinus* é capaz de metabolizar a sacarose em ácido láctico. O ambiente ácido criado por esse processo leva à desmineralização do esmalte e, conseqüentemente, ao aparecimento de lesões de cárie (van Houte, 1980; de Soet et al., 2000; Rupf et al., 2006).

S. gordonii, *S. mitis*, e *S. sanguinis* são conhecidos pelo seu papel de colonizadores primários da superfície dentária (Ericson e Rundegren, 1983, Kawamura et al., 1995; Rosan e Lamont, 2000). Com a progressão da lesão, *Lactobacillus* sp. também são observados (Thomas et al., 2008). Além dessas espécies, bactérias do gênero *Actinomyces* spp. estão entre as espécies pioneiras em superfícies dos dentes e são sempre encontrados cavidade bucal ao longo do amadurecimento do biofilme dentário (Marsh, 1994).

A seleção dos óleos essenciais e terpenos utilizados no presente estudo baseou-se em relatos anteriores sobre sua atividade bactericida para *S. mutans* e *S. sobrinus* (Santos et. al., 2010) na forma

planctônica. Atualmente, porém, é conhecida a importância de estudos de atividade antimicrobiana sobre os biofilmes microbianos, já que a cárie é relacionada diretamente aos biofilmes formados sobre a superfície dentária. Biofilmes bacterianos são formados por micro-organismos que se unem para formar uma comunidade, que está ligada a uma superfície sólida e envolto em uma matriz de exopolissacarídeo, podendo ser constituído por uma única ou múltiplas espécies de bactérias (Whittaker et al., 1996; Thien-Fah et al., 2001). Em muitos estudos tem-se observado que a resistência das biofilmes a antibióticos está aumentada em comparação com o que observa-se normalmente com células planctônicas, podendo ser 10 a 1000 vezes mais resistentes aos efeitos de agentes antimicrobianos (Prosser et al., 1987; Nickel et al., 1985; Thien-Fah et al., 2001. A matriz de glicocálice, presente no biofilme modifica o ambiente das células aderentes pela presença de nutrientes concentrados, protegendo as células de surfactantes, biocidas e células fagocíticas (Costerton et al., 1995; Thien-Fah et al., 2001, Spratt, Pratten, 2003).

O delineamento experimental do presente estudo incluiu a triagem inicial empregado a métodos de difusão em ágar (técnica do poço em camada dupla) Segundo Nascimento et al. (2008), no teste de difusão em ágar, halos com um diâmetro maior que 7 mm sugerem uma atividade antimicrobiana promissora. Entretanto, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, este parâmetro não parece ser aplicável de forma direta para todos os tipos de produtos naturais, visto que os resultados obtidos para no presente estudo para o terpeno eucaliptol mostrou um halo maior que 7 mm. Nos demais testes realizados de atividade antimicrobiana de avaliação ele não apresentou efeito antimicrobiano promissor, quando comparado com os demais óleos estudados (tabelas 1e 2, paginas 48 e 50)

Analisando esses fatos, sugere-se que esta técnica não seja ideal para avaliação de óleos essenciais. Esta observação corrobora

observações anteriores de que a natureza hidrofóbica da maioria dos óleos essenciais de plantas pode ser um interferente, uma vez que essa característica impede a difusão uniforme destas substâncias através do meio contendo ágar (Lambert et al., 2001; Setzer et al., 2004; Sokmen et al., 2004). Portanto, acredita-se que a vantagem dessa técnica é limitada à geração de dados preliminares fornecendo, apenas, dados qualitativos iniciais, porém deve ser utilizada com cautela no caso de óleos essenciais.

O método de microdiluição, preconizado pelo CLSI, foi utilizado para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) durante a avaliação da atividade antibacteriana. Este método permitiu verificar a atividade antimicrobiana dos óleos estudados, conferindo um confiável índice de CIM. Para realização desta técnica o uso de solventes, detergentes ou agentes emulsificadores, como o propilenoglicol, utilizado neste estudo, é comum visando a facilitar a dispersão dos óleos, no meio de cultura (Groppo et al., 2002; Baydar et al., 2004; Bruni et al., 2004). As propriedades físicas e químicas dos emulsificadores são importantes para auxiliar na visualização da atividade antimicrobiana dos óleos, entretanto, deve-se levar em consideração as possíveis interações com a substância em teste, como uma possível influência sobre o crescimento bacteriano e/ou sobre a permeabilidade da membrana celular (Nascimento et al., 2008). No presente estudo, o propilenoglicol apresentou-se como excelente emulsificador, não demonstrando atividade antimicrobiana em nenhum dos testes realizados.

O 1,8 cineole foi avaliado no estudo de Hendry et al. (2009), onde a CIM para suspensões planctônicas de *S. aureus*, *S. aureus* resistente à metilicina (MRSA), *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans* foi determinada. Os resultados variaram de 8 g/L a >256 g/L entre os micro-organismos testados. Apesar dos micro-organismos testados não pertencerem ao grupo utilizado neste estudo, esses valores de CIM corroboram com os resultados desse estudo, visto que a CIMs

apresentaram concentrações superiores a 25 µl/ml. No presente estudo, diante das bactérias cariogênicas, o mesmo apresentou CIMs superiores quando comparados com os demais óleos essenciais estudados.

Outra observação de interesse relaciona-se à maior atividade dos óleos essenciais quando comparados com as substâncias isoladas selecionadas. Isso pode se dar ao fato de que alguns componentes presentes nos óleos podem não possuir a atividade antimicrobiana principal, porém ser um facilitador, com por exemplo o 1,8-cineole, que é capaz de aumentar a permeabilidade da membrana facilitando a entrada de outros agentes antimicrobianos e por isso alguns autores consideram que este apresenta efeito antimicrobiano marginal (Groppo, 2002; Hammer et al., 2003).

Entre os micro-organismos avaliados, *S. mitis* apresentou-se mais resistente frente as drogas – teste. Tal observação não encontrou nenhuma explicação biológica na literatura, o que sugere que novos estudos devam ser realizados para explorar este resultado.

No presente estudo, o óleo essencial de *T. vulgaris* apresentou atividade antibacteriana (CIMs de 1,56 µl/ml) frente a *S. mutans* e *S. sobrinus*. Este resultado está de acordo com Gebara et al. (1996) que também verificou o mesmo resultado, obtendo CIMs para *S. mutans* de 0,06 mg/ml e para o *S. sobrinus* de 0,04 mg/ml.

No teste de adesão microbiana utilizando microcosmo, o presente estudo revelou que o óleo essencial do tomilho apresentou ação inibitória sobre o crescimento microbiano e sobre a aderência ao esmalte dentário em uma concentração de 0,78 µl/ml. Entretanto, Carretto et al. (2007) relataram que o chá de *T. vulgaris* (10% das folhas em água destilada) não foi capaz de inibir a aderência de *S. mutans* ao esmalte dentário. Salientamos que a análise microbiológica do microcosmo utilizado no presente estudo detectou a presença de estreptococos do grupo mutans e *Lactobacillus* spp., o que sugere que os resultados obtidos são comparáveis com os relatados por Carretto et al. (2007).

Diante disso, mais estudos são necessários para avaliar a atividade anti-aderência do óleo essencial de *T. vulgaris*.

O presente estudo demonstrou que todos os óleos essenciais avaliados apresentaram atividade bactericida e bacteriostática frente às cepas padrão e clínicas. Porém, observou-se que tal atividade não foi detectada para o terpeno eucaliptol frente a *L. acidophilus*. Os *Lactobacillus* spp. são bactérias Gram-positivas com alto potencial cariogênico. O frequente consumo de carboidratos fermentáveis pode levar a constantes quedas de pH no biofilme gerando aumento nas proporções de espécies sacarolíticas, acidúricas e acidogênicas como os estreptococos do grupo *mutans* e lactobacilos. O aumento na proporção dessas espécies leva à produção cada vez maior de ácido, promovendo a desmineralização do dente e deixando a superfície dental mais susceptível ao aparecimento de lesões de cárie (De Lorenzo, De Lorenzo, 2004). As CIMs registradas para os isolados clínicos do grupo *mutans* apresentam-se mais resistentes quando comparada com as amostras de *Lactobacillus* spp.

Os óleos essenciais do gênero *Cymbopogon* utilizados nesse trabalho tiveram sua atividade antimicrobiana descrita anteriormente. Entretanto, são poucos os relatos na literatura sobre a atividade antimicrobiana desse gênero sobre bactérias cariogênicas, especialmente em biofilmes. Betoni et al. (2008) relataram a atividade antimicrobiana de *C. citratus* contra *Staphylococcus aureus*. A atividade dessa espécie também foi registrada para *Saccharomyces cerevisiae* (Helal et al., 2006) e para *S.aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* nos trabalhos de Okigo e Mmekka (2008). Neste trabalho foram observados CIMs com concentração de 1,56 µl/ml a 12,5 µl/ml, onde registramos as menores concentrações, dentro do gênero, para *C. citratus*.

O óleo essencial de *H. spicigera* apresentou-se eficiente, em todas as concentrações, tanto para o teste de biofilme de microcosmo,

estudadas, quanto para os isolados clínicos e padrão em células planctônicas. Este resultado é muito promissor e indica a necessidade de estudos mais aprofundados com este óleo. Na literatura não foram encontrados estudos com a *H. spicigera* frente a biofilme de microcosmo ou sobre micro-organismos precursores da cárie.

Santos et al. (2010), em estudo com *T. vulgaris*, relataram CIM de 100 µg/mL em culturas planctônicas de *S. mutans*. Outro estudo relata que a associação de *T. vulgaris* diluído em etanol e isoladamente (diluído em óleo mineral) foram eficazes frente a *S. mutans* (Gonçalves et al., 2011). No presente estudo a CIM registrada para esse micro-organismo foi de 1,56 µl/mL no estado planctônico. Os resultados apresentados para os outros micro-organismos não puderam ser comparados devido à ausência de trabalhos semelhantes na literatura.

A caracterização química dos óleos essenciais de *T. vulgaris*, *H. spicigera* e *C. citratus* foi realizada utilizando a cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG/MS), determinando-se a porcentagem dos constituintes majoritários presentes na amostra. *T. vulgaris* apresentaram como componente o carvacrol, α -pineno e cimeno, corroborando com o trabalho de Santos et al. (2010). Entretanto, neste estudo foi verificada a presença de timol e canfeno, sendo este último como um dos componentes majoritário da amostra. Essa variação da composição dos óleos dentro de um mesmo gênero é evidenciada por Stahl-Biskup (2002).

Os principais constituintes do óleo essencial de *C. citratus* analisados nesse estudo foram geranial e neral. Esses dados corroboram com o estudo de Pereira et al. (2008) onde os principais constituintes do óleo essencial do *C. citratus* (capim-limão) identificados e quantificados foram neral (40,2%), geranial (31,8%). Craveiro et al. (1981) avaliando a composição química do óleo essencial dessa planta, identificou que o citral (mistura isomérica de neral e citral) são majoritários e responsáveis pelo aroma cítrico da planta. Sacchetti et al. (2005) comprovou a atividade

antimicrobiana do óleo essencial de *C. citratus*, pela análise de seus constituintes químicos por CG/EM. Estes autores relataram 0,43% de metil-5-epten-2-ona, 15,48% de mircenol, 1,28% de linalol, 32,3% de linal, 3,35% de geraniol e 41,3% de geranial.

Algumas variações na composição dos óleos podem ser justificadas pelas diferenças em razão da época de plantio, tipo de solo, clima entre outros. A cromatografia gasosa do óleo de *H. spicigera* revelou a composição majoritária de α -pineno, seguido de cineol.

No presente estudo, foram selecionadas as superfícies de vidro e de esmalte dentário para o crescimento de biofilme, ambos utilizando microcosmo. A utilização do biofilme de microcosmo como modelo experimental possui vantagens pois permite manter a maior parte da complexidade e heterogeneidade do biofilme dentário presente *in vivo* (McBain, 2009). A saliva humana mostra-se ideal para a coleta de microcosmo no biofilme da placa dental (McBain, 2009). No presente estudo todos os óleos selecionados para o teste anti-biofilme foram capazes de inibir o crescimento do biofilme. Segundo Cheng et al. (2011), os resultados sugerem que o biofilme microcosmo usando saliva humana como inóculo é um modelo útil para avaliar a atividade bacterianas. A inibição total apresentada no presente estudo também pode ser relacionada à possível competição entre os micro-organismos do microcosmo (Tanzer et al., 2012).

Os excelentes resultados obtidos para os óleos de *C. citratus*, *T. vulgaris* e *H. spicigera* contra bactérias cariogênicas planctônicas ou em biofilme obtidos neste estudo abrem possibilidades promissoras para a elaboração de formulações farmacêuticas para utilização na prevenção da cárie dentária. Estudos desta natureza revelam a importância de se entender o mecanismo de ação desses óleos essenciais. Estudos futuros sobre a citotoxicidade devem ser realizados para possibilitar a aplicação clínica destes achados.

7 CONCLUSÃO

A análise dos resultados obtidos no presente estudo sugere as seguintes conclusões:

- a) Os óleos essenciais de *C. citratus*, *C. martinii*, *C. flexuosus*, *H. spicigera* e *T. vulgaris* apresentaram ação bactericida e bacteriostático contra bactérias cariogênicas;
- b) Os óleos essenciais de *C. citratus*, *T. vulgaris* e *H. spicigera* foram capazes de impedir a adesão de micro-organismos bucais ao esmalte dentário;
- c) Os componentes isolados citral e cineole apresentaram atividade antibacteriana frente a bactérias cariogênicas;
- d) Os óleos essenciais de *C. citratus*, *T. vulgaris* e *H. spicigera* avaliados foram eficazes na desestruturação de biofilme de microcosmo;
- e) Os óleos essenciais de *T. vulgaris*, *C. citratus* e *H. spicigera* apresentaram atividade bactericida e bacteriostática frente a isolados clínicos do grupo mutans e *Lactobacillus* spp.

5 REFERÊNCIAS *

Aas JA, 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.

Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, et al. Of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. J Clin Microbiol. 2008;46(4):1407-17.

Adukwu EC, Allen SCH, Phillips CA. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. J Appl Microbiol. 2012. [Epub ahead of print].

Albuquerque ACL, Pereira MSV, Pereira JV, Costa MRM, Higino JS. Efeito antimicrobiano do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre micro-organismos cariogênicos. Arq Odontol. 2008;44(4):05-10.

Almeida JRGA, Silva-Filho RN, Nunes XP, Dias CS, Pereira FO, Lima EO. Antimicrobial activity of the essential oil of *Bowdichia virgilioides* Kunt. Rev Bras Farmacogn. 2006;16:638-41.

Alviano WS, Mendonça-Filho RR, Alviano DS, Bizzo HR, Souto-Pradón T, Rodrigues ML, et al. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. Oral Microbiol Immunol. 2005;20(2):101-5.

*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

Angioni A, Barra A, Russo MT, Coroneo V, Dessi S, Cabras P. Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. J Agric Food Chem. 2003;51(10):3073-8.

Anita, S, Katewa SS. 2001. In-vitro studies on anti-fungal activity of essential oil of *Cymbopogon martinii* and *Cymbopogon citratus*. Indian Perfumer.2001;45: 53–56.

Arruda TA, Antunes RMP, Catão RMR, Lima EO, Sousa DP, Nunes XP, et al. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa Hudson* essential oil, rotundifolone and its analogues. Rev Bras Farmacogn. 2006;16(3):307-11.

Arweiler NB, Donos N, Netuschil L, Reich E, Sculean A. Clinical and antibacterial effect of tea tree oil - a pilot study. Clin Oral Investig. 2000;4(2):70-3.

Autio-Gold J. The role of chlorhexidine in caries prevention. Oper Dent. 2008;33(6):710-6.

Badet MC, Richard B, Dorignac G. An in vitro study of the pH-lowering potential of salivary lactobacilli associated with dental caries. J Appl Microbiol. 2001;90(6):1015-8.

Baydar H, Saõdiç O, Karadođan OG. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. Food Control 2004;15(3):169-72.

Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. J Clin Microbiol. 2002;40(3):1001-9.

Beighton D, Miller WA. A microbiological study of normal flora of macropod dental plaque. J Dent Res.1977;56(8):995-1000.

Beighton D, Brailsford S, Saramaranayake LP, Brown JP, Ping FX, Grant-Mills D, et al. A multi-country comparison of caries-associated microflora in demographically diverse children. *Community Dent Health*. 2004;21(1suppl):96-101.

Benkeblia N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensm. Wiss. Technol*. 2004;37:263-68.

Betoni JEC, Mantovani RP, Barbosa LN, Di Stasy LC, Fernandes Junior A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(4):387-90.

Bispo MD, Mourao RHV, Franzotti EM, Bomfim KBR, Arrigoni-Blank MD, Moreno MPN, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. *J Ethnopharmacol*, 2001;76(1):81-6.

Bordignon SALO. Gênero *Hyptis* Jacq. (Labiatae) no Rio Grande do Sul. [dissertação]. Porto Alegre: Instituto de Biociências: UFRG - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1990.

Bowden GH. Does assessment of microbial composition of plaque/saliva allow for diagnosis of disease activity of individuals? *Community Dent Oral Epidemiol*. 1997;25(1):76-81.

Bowen WH. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(2):126-31.

Brailsford SR, Tregaskis RB, Leftwich HS, Beighton D. The predominant *Actinomyces* spp. isolated from infected dentin of active root caries lesions. *J Dent Res*. 1999;78(9):1525-34.

Bruneton J. Pharmacognosie – phytochimie, plantes medicinales. 3 ed. Paris: Tec & Doc Lavoisier; 1999.

Bruni R, Medici A, Andreotti E, Fantin C, Muzzoli M, Dehesa M, et al. Chemical composition and biological activities of *Ishpingo* essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm (Lauraceae) flower calyces. Food Chem. 2004;85: 415-21.

Bruschi ML, Lara EH, Martins CH, Vinholis AH, Casemiro LA, Panzeri H, et al. Preparation and antimicrobial activity of gelatin microparticles containing propolis against oral pathogens. Drug Dev Ind Pharm. 2006;32(2):229-38.

Cardoso CL, Prado RF, Taveira LAA. Estudo macro e microscópico da resposta tecidual frente ao uso de anti-sépticos bucais e sua influência na carcinogênese. J Appl Oral Sci. 2005;13:286-90.

Carlsson P, Gandour IA, Olsson B, Rickardsson B, Abbas K. High prevalence of mutans streptococci in a population with extremely low prevalence of dental caries. Oral Microbiol Immunol. 1987; 2(3):121–24.

Carranza FA, Newman MG . Periodontia clinica. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan;1997.

Carretto CFP, Navas EAFA, Paradella TC, Oliveira LD, Junqueira JC, Jorge AOC. Efeitos do chá de tomilho sobre a aderência in vitro de *Streptococcus mutans* ao esmalte dentário e *Candida albicans* à resina acrílica Revde Odontol UNESP. 2007;36(3):281-86.

Carvalho I. Introduction to molecular modeling of drugs in the medicinal chemistry experimental course. Quim Nova. 2003;26:428-38.

Carvalho ACB, Nunes DSG, Baratelli TG, Shuqair NSMSAQ, Netto EM. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. T&C Amazônia. 2007;11(5):26-32.

Castro LO, Ramos RLD. Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais: *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., capim-cidrô, *Cymbopogon martinii* (Rox.) Watson FJ, palma-rosa, *Cymbopogon nardus* (L.)Rendle,

citronela, *Elyonurus candidus* (Trin.) Hack, capim-limão, *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash, vetiver. Porto Alegre: Fepagro; 2003.

Cheng L, Exterkate RA, Zhou X, Li J, ten Cate JM. Effect of *Galla chinensis* on growth and metabolism of microcosm biofilms. Caries Res. 2011;45(2):87-92.

Chung JY, Choo JH, Lee MH, Hwang JK. Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragrans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. Phytomedicine. 2006;13(4):261-6.

Claffey N. Essential oil mouthwashes: a key component in oral health management. J Clin Periodontol. 2003;30(5 Suppl):22-4.

Corby PM, Lyons-Weiler J, Bretz WA, Hart TC, Aas JA, Boumenna T, et al. Microbial risk indicators of early childhood caries. J Clin Microbiol. 2005;43(11):5753-9.

Cortez LER, Jacoomossi E, Cortez DAG. Levantamento das plantas medicinais utilizadas na medicina popular de Umuarama, PR. Arq. Ciênc. Saúde Unipar. 1999;3(2):97-104.

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. Annu Rev Microbiol. 1995;49:711-45.

Craveiro AA, Fernandes AG, Andrade CHS, Matos FJA, Alencar JW, Machado MIL. Óleos essenciais de Plantas do Nordeste. Fortaleza: UFC; 1981.

Davey ME, O'Toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Biol Rev. 2000;64(4):847-67.

De Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DM. Presence of *mutans streptococci* and *Candida spp.* in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. Arch Oral Biol. 2006; 51(11):1024-28.

De Lorenzo JL, De Lorenzo A. Microbiologia para o estudante de microbiologia: cariologia – etiopatogenia da cárie dental. São Paulo: Atheneu; 2004.

Dent VE, Marsh PD. Evidence for a basic plaque microbial community on the tooth surface in animals. Arch. Oral Biol. 1981;26(3):171-9.

De Soet JJ, Nyvad B, Kilian M. Strain-related acid production by oral streptococci. Caries Res. 2000;34(6):486–90.

De-Souza MM, Garbeloto M, Denez K, Eger-Mangrich I. Avaliação dos efeitos centrais dos florais de Bach em camundongos através de modelos farmacológicos específicos. Rev Bras Farmacogn. 2006;16(3):365-71.

Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ Jr, et al. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. Appl Environ Microbiol. 2006;72(4):2837-48.

Ericson T, Rundegren J. Characterization of a salivary agglutinin reacting with a serotype strain of *Streptococcus mutans*. Eur J Biochem 1983;133(2):255-61.

Falcão DQ, Menezes FS. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. Rev Bras Farmacogn. 2003;84:69-74.

Farsi N. Dental caries in relation to salivary factors in Saudi population groups. J Contemp Dent Pract. 2008;9(3):16-23.

Ferronato R, Marchesan ED, Bednarski F, Ribas TTZ, Onofre SB. Efeitos do óleo essencial produzido por *Baccharis dracunculifolia* DC. (asteraceae) sobre bactérias cariogênicas. Arq. Ciênc. Saúde Unipar. 2007;11(1):15-8.

Fine DH, Furgang D, Barnett ML, Drew C, Steinberg L, Charles CH, et al. Effect of an essential oil-containing antiseptic mouthrinse on plaque and salivary *Streptococcus mutans* levels. J Clin Periodontol. 2000;27(3):157-61.

Fujiwara T, Sasada E, Mima N, Ooshima T. Caries prevalence and salivary *mutans streptococci* in 0–2-year-old children of Japan. Community Dent Oral Epidemiol. 1991;19(3):151–4.

Funari CS, Ferro VO. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. Rev Bras Farmacogn. 2005;15(2):178-82.

Furneri PM, Paolino D, Saija A, Marino A, Bisignano G. In vitro antimycoplasmal activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil. J Antimicrob Chemother. 2006;58(3):706-7.

Gangrade SK, Shrivastava RD, Sharma OP, Moghe MN, Trivedi KC. Evaluation of some essential oils for anti-bacterial properties. Indian Perfumer. 1990;34:204–8

Gebara ECE, Zardetto CGDC, Mayer MPA. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. Rev Odontol Univ São Paulo. 1996;10(4):251-6.

Gonçalves GMS, Bottaro M, Nilson AC. Effect of the *Thymus vulgaris* essential oil on the growth of *Streptococcus mutans*. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2011;32(3):375-80

Grayer RJ, Harborne JB. A survey of antifungal compounds from higher plants (1982–1993). Phytochemistry. 1994;37(1):19–42.

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

Gunsolley, JC. A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents. J Am Dent Assoc. 2006;137(12):1649-57.

Halcon L, Milkus K. *Staphylococcus aureus* and wounds: a review of tea tree oil as a promising antimicrobial. Am J Infect Control. 2004;32(7):402-8.

Hammer KA, Johnson M, Dry L, Michalak EM, Carson CF, Riley TV. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro. Oral Microbiol Immun. 2003;18(3):389-92.

Harley RM. Revision of generic limits in *Hyptis* Jacq. And its allies. Bot J Linn Soc. 1988;98:87-95.

Helal GA, Sarhan MM, Abu Shahla ANK, Abou EK. Effect of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on growth and morphogenesis of *Saccharomyces cerevisiae* ML2-strain. J Basic Microbiol. 2006;46(5):375-86.

Hendry ER, Worthington T, Conway BR, Lambert PA. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. J Antimicrobial Chemother. 2009;64(6):1219–25.

Hirose H. Close association between *Streptococcus sobrinus* in the saliva of young children and smooth surface caries increment. Caries Res. 1993;27(4):292-7

Hoffmann FL, de Souza SJF, Garcia-Cruz CH, Vinturim TM, Dutra AL. Determinação da atividade antimicrobiana “in vitro” de quatro óleos essenciais de especiarias. B Ceppa. 1999;17(1):11-20.

Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm. J Dent Res. 2009;88(11):982-90.

Horiuchi M, Washio J, Mayanagi H, Takahashi N. Transient acid-impairment of growth ability of oral *Streptococcus*, *Actinomyces*, and *Lactobacillus*: a possible ecological determinant in dental plaque. Oral Microbiol Immunol. 2009;24(4):319-24.

Husain A, Virmani OP, Popli SP, Misra LN, Gupta MM, Srivastava GN, et al. Dictionary of Indian Medicinal Plants. Lucknow:CIMAP;1992.

Inouye S, Uchida K, Yamaguchi H. In vitro and in vivo anti-Trichophyton activity of essential oils by vapour contact. Mycoses 2001;44(3-4):99-107.

International Organization for Standardization. International Standard ISO 10993-12. Biological evaluation of medical devices – part 12: sample preparation and reference materials. Geneva; 1996.

Jakubovics NS, Stromberg N, van Dolleweerd CJ, Kelly CG, Jenkinson HF. Differential binding specificities of oral streptococcal antigen I/II family adhesins for human or bacterial ligands. *Mol Microbiol*. 2005;55(5):1591–605.

Jarvinen H, Tenovuo J, Huovinen P. In vitro susceptibility of *Streptococcus mutans* to chlorhexidine and six other antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1993;37(5):1158–59.

Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF. Plant systematic: a phylogenetic approach. Inglaterra: Sinauer Associates Inc;1999.

Karchmer AW. Increased antibiotic resistance in respiratory tract pathogens: protekt us an update. [Clin Infect Dis](#). 2004;1(39):142-50.

Karpanen TJ, Worthington T, Hendry ER et al. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(5):1031–6.

Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Miura H, Ezaki T. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bacteriol*. 1995;45(2):406-8.

Keijser BJ, Zaura E, Huse SM, van der Vossen JM, Schuren FH, Montijn RC, et al. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res* 2008;87(11):1016-20.

Kelsey RG, Reynolds GW, Rodriguez E, Rodriguez E, Healey PL, Mentha I. Biology and chemistry of plant trichomes. New York:Plenum Press;1984.

Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries: Findings and implications. Arch. Oral Biol. 1960;1:304-20.

Kneist S, Schmidt S, Callaway A, Willershausen B, Rupf S, Wicht M et al. Diversity of *Lactobacillus* species in deep carious lesions of primary molars. Eur Arch Paediatr Dent. 2010 Aug;11(4):181-6.

Kohler B, Birkhed D, Olsson S. Acid production by human strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Caries Res. 1995;29(5):402–6.

Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. Annu Rev Microbiol. 2000;54:413–37.

Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer Jr RJ. Communication among oral bacteria. Microbiol Mol Biol Rev. 2002 Sep;66(3):486-505.

Ladan Z, Amupitan JO, Okonkwo EM, Aimola Habila N. Antimicrobial potency of *Hyptis spicigera* leaf extracts against some pathogenic microorganisms. Plants Res. 2009;11(3):905-8.

Lambert RJ, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J Appl Microbiol. 2001;91(3):453-62.

Lee MH, Bostock RM. Induction, regulation, and role in pathogenesis of appressoria in *Monilinia fructicola*. Phytopathology. 2006;96(10):1072-80.

Leitão DPS, Silva Filho AA, Polizello ACM, Bastos JK, Spadaro ACC. Comparative evaluation of in-vitro effects of brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. Biol Pharm Bull. 2004;27:1834-39.

Leites ACBR, Pinto MB, Sousa ER. Aspectos microbiológicos da cárie dental. Salusvita. 2006;25(2):135-48.

Lima KC, Coelho LT, Pinheiro IV, Roças IN, Siqueira JF Jr. Microbiota of dentinal caries as assessed by reverse-capture checkerboard analysis. *Caries Res.* 2011;45(1):21-30.

Lis-Bachin M, Deans SG. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *J Appl. Bacteriol.* 1997;82(6):759-62.

Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986;50(4):353-80.

Loesche WJ. The specific plaque hypothesis and the antimicrobial treatment of periodontal disease. *Dent Update.* 1992;19(2):68–74.

Lorenzo JL, Lorenzo A. Cariologia: etiopatogenia da carie dental. In: Lorenzo JL, editor. *Microbiologia para o estudante de Odontologia*. SaoPaulo: Editora Atheneu; 2004.

Mah TC, Otoo GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiology.* 2001;9(1):34-9.

Marinho BVS, Araújo ACS. Uso dos enxaguatórios bucais sobre a gengivite e biofilme dental. *Int J Dent.* 2007;6(4):124-31.

Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994;8(2):263–71.

Martin FE, Nadkarni MA, Jacques NA, Hunter N. Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *J Clin Microbiol.* 2002;40(5):1698-704

Martini ND, Katerere DR, Eloff JN. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *J Ethnopharmacol.* 2004;93(2-3):207–12.

May A, Bovi AO, Maia NB, Moraes ARA, Pinheiro MQ, Mario M. Influência do intervalo entre cortes sobre a produção de biomassa de duas espécies de capim limão. *Horticultura Brasileira*. 2008;826:379-82.

McBain AJ. In vitro biofilm models: an overview. *Adv Appl Microbiol* 2009;69:99–132.

McClure FF, Hewitt WL. The relation of penicillin to induce rat dental caries and oral *Lactobacillus acidophilus*. *J Dent Res*. 1946;25(6):441-3.

Miller WD. *The Microorganisms of the Human Mouth*. Philadelphia:white dental manufacturing co;1890.

Ming LC. Yield of essential oil and citral content in different parts of lemongrass leaves *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf - Poaceae. *Acta Horticulturae*. 1996;426(1):555-9.

Mothana RA, Lindequist U, Gruenert R, Bednarski PJ. Studies of the in vitro anticancer, antimicrobial and antioxidant potentials of selected Yemeni medicinal plants from the island Soqatra. [BMC Complement Altern Med](#). 2009;25:7-9.

Munson MA, Banerjee A, Watson TF, Wade WG. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J Clin Microbiol*. 2004 Jul;42(7):3023-9.

Naimi TS, LeDell KH, Boxrud DJ, Groom AV, Steward CD, Johnson SK, et al. Epidemiology and clonality of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Minnesota:1996-1998. *Clin Infect Dis*. 2001;33(1):990-6.

Nascimento PFC, Alviano WS, Nascimento ALC, Santos PO, Arrigoni-Blank MF, de Jesus RA, et al. *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-*Streptococcus mutans* activity *Oral Dis*. 2008;14(6):485–9.

NCCLS/CLSI. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras: norma aprovada – 2ed. NCCLS document M27-A2 (ISBN 1- 56238-469-4). NCCLS, 940.Pensylvania 19087-1898 U.S.A., 2002).

Nesbitt WE, Beem JE, Leung KP, Clark WB. Isolation and characterization of *Actinomyces viscosus* mutants defective in binding salivary proline-rich proteins. Infect Immun. 1992;60(3):1095-100.

Newbrun E . Uses and abuses of the news release/press conference.J Dent Res. 1988;67(11):1442-3.

Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary tract catheter. Antimicrob. Agents Chemother.1985;27(4): 619–24.

Nunes XP, Maia GLA, Almeida JRGS, Pereira FO, Lima EO. Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia*. L. Rev Bras Farmacogn. 2006;16:642-44.

Okada M, Soda Y, Hayashi F, Doi T, Suzuki J, Miura K, et al. Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in pre-school children. J Med Microbiol. 2005;54:661-5.

Okigbo RN, Mmekaka EC. Antimicrobial effects of three tropical plant extracts on *Ataphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* Afr. J. Trad. CA. 2008;5(3):226–9.

Oliva BP, Ceddia E, Pontieri E, Aureli P, Ferrin AM. Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. Letters Appl Microbiol. 2003;37:185-7.

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

Oliveira RAG, Lima EO, Vieira WL, Freire KRL, Trajano VN, Lima, IO, et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. Rev Bras Farmacog. 2006a;16(1):77-82.

Oliveira FP, Lima EO, Siqueira Júnior JP, Souza EL, Santos BHC, Barreto HM. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. Rev Bras Farmacogn. 2006b;16(2):510-16.

Onawunmi GO. In vitro studies on the antibacterial activity of phenoxyethanol in combination with lemon grass oil. Pharmazie.1989;43(1):42-4.

Orland FJ, Blayney JR, Harrison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Wagner M et al. Use of the germfree animal technic in the study of experimental dental caries: I basic observations on rats reared free of all microorganisms. J Dent Res. 1954;33(2):147-74.

Oyedji OA, Afolayan AJ. Chemical composition an antibacterial activity of essential oil of the South African *Mentha longifolia*. J Essent Oil Res. 2006;18:57-59.

Pan P, Barnett ML, Coelho J, Brogdon C, Finnegan MB. Determination of the in situ bactericidal activity of an essential oil mouthrinse using a vital stain method. J Clin Periodontol. 2000;27(4):256-61.

Paraskevas S. Randomized controlled clinical trials on agents used for chemical plaque control. International J Dent Hyg. 2005;3(4):162-78.

Pascoal CRFA, Lourenço CC, Sodek L, Tamashiro JY, Franchi GJr, Nowill A, et al. Essential oil from the leaves of *Campomanesia guaviroba* (DC.) Kiaersk. (Myrtaceae): chemical composition, antioxidant and cytotoxic activity. J. Essential Oil Res. 2011;23:34-7.

Paterson DL. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. [Clin Infect Dis](#). 2006;1(suppl 2):43-8.

Pereira AA, Cardoso MG, Abreu LR, Moraes AR, Guimarães LGL, Salgado APSP. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Ciênc. Agrotec. 2008;32(3):887-93.

Pereira EMR, [Pereira EM](#), [Gomes RT](#), [Freire NR](#), [Aguilar EG](#), [Brandão MD](#) et al. In vitro antimicrobial activity of brazilian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms of Interest to dentistry. Planta Med. 2011;77(4):401-4.

Pozzatti, P. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. Mycoses. 2010;53(1):12-15.

Preza D, Olsen I, Willumsen T, Boches SK, Cotton SL, Grinde B, et al. Microarray analysis of the microflora of root caries in elderly. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009;28(5):509-17.

Prosser BL, Taylor D, Dixand BA, Cleeland R. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. Antimicrob. Agents Chemother. 1987;31(10):1502-6.

Rehder VLG, Machado ALM, Delarmelina C, Sartoratto A, Figueira GM, Duarte MCT. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum applii* e *Origanum vulgare*. Rev Bras Plant Med. 2004;6: 67-71.

Riihinen K, Ryyanen A, [Toivanen M](#), [Könönen E](#), [Törrönen R](#), [Tikkanen-Kaukanen C](#). Antiaggregation potential of berry fractions against pairs of *Streptococcus mutans* with *Fusobacterium nucleatum* or *Actinomyces naeslundii*. [Phytother Res](#). 2011;25(1):81-7.

Rodrigues MR, Maciel SM, Ferreira FBA, Piovezan A, Pieralisi FJS, Poli-Frederico RC. Analysis of serotypes and gene for mutacins in *Streptococcus mutans* isolated from preschool children with different caries experiences. Cienc Odontol Bras. 2008;11(4):40-6.

Rogosa M, Mitchell JA, Wiseman RF. A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. *J Dent Res.* 1951;30(5):682-9.

Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes Infect.* 2000;2(13):1599-607.

Rosato A, Vitali C, Piarulli M, Mazzota M, Argentieri MP, Mallamaci R. In vitro synergic efficacy of the combination of Nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species. *Phytomedicine.* 2009;16(10):972–5.

Rupf S, Merte K, Eschrich K, Kneist S. *Streptococcus sobrinus* in children and its influence on caries activity. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2006;7(1):17-22.

Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food chemistry.* 2005;91(4):621-32.

Salzer UJ. The analysis of essential oils and extracts (oleoresins) from seasonings-a critical review. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr.* 1977;9(4):345-73.

Samaranayake LP. Normal oral flora, the oral ecosystem and plaque biofilms. *Essential microbiology for dentistry.* 3 ed. Philadelphia:Elsevier;2006.

Santos IR, Pereira DFA, Teodoro GR, Del Ciampo JR, Ogasawara MS, Canettieri ACV, et al. Óleo essencial de *Thymus vulgaris* : elaboração de enxaguatório bucal e avaliação do efeito in vitro na formação de placa bacteriana. *Lat Am J Pharm.* 2010;29(6):941-7.

Sarkonen N, Könönen E, Summanen P, Kanervo A, Takala A, Jousimies-Somer H. Oral colonization with *Actinomyces* species in infants by two years of age. *J Dent Res.* 2000;79(3):864-7.

Schuck VEJA, Fratini M, Rauber CS, Henriques A, Schapoval EES. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. Braz J Pharm Sci. 2001;37(1):45-9.

Selwitz RH, Ismail AL, Pitts NB. Dental caries. Lancet. 2007 6;369(9555):51-9.

Senatore F. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a Thyme (*Thymus pulegioides* L.) Growing Wild in Campania (Southern Italy). J Agr Food Chem.1996;44(5):1327-32.

Senatore F, Arnold NA, Piozzi F. Chemical composition of the essential oil of *Salvia multicaulis* Vahl. var. *simplicifolia* Boiss. growing wild in Lebanon. J Chromatogr. 2004;(15):237-40.

Setzer WN, Vogler B, Schmidt JM, Leahy JG, Rives R. Antimicrobial activity of *Artemisia douglasiana* leaf essential oil. Fitoterapia.2004;75(2):192-200.

Sikkema J, Bont JAM, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol Rev. 1995;59(2):813-29.

Silva CB, Guterres SS, Weisheimer V, Schapoval EES. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida spp*. Braz J Infect Dis. 2008;12(1):63-6.

Silva MSA, Silva MAR, Higino JS, Pereira MSV, Carvalho AAT. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. Braz J Pharmacogn. 2007;(2):236-40.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia, da planta ao medicamento. 5 ed. Florianópolis:UFRGS;2004.

Soares MMSR, Cury AE. In vitro activity of antifungal and antiseptic agents against dermatophyte isolates from patients with tinea pedis. Braz. J. Microbiol. 2001;32(2):130-4.

Sokmen A, Gulluce M, Akpulat HA, Daferera D, Tepe B, Polissiou M, et al. The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. Food Control 2004;15(8): 627-34.

Spellberg B, Powers JH, Brass EP, Miller LG, Edwards JE Jr. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. [Clin Infect Dis.](#) 2004;138(9):1279-86.

Spratt DA, Pratten J. Biofilms and the oral cavity. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 2003;(2):109-20.

Stahl-biskup E. Essential oil chemistry of the genus *Thymus* —a global view; Thyme: The genus *Thymus*. Lodon: Taylor & Francis; 2002.

Stangarlin RJ, Schwan-Estrada KRF, Nozaki MH. Plantas medicinais e controles alternativos de fitopatógenos. Biotecnol Cienc Des. 1999;11:16-21.

Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. Caries Res. 2008;42(6):409-18

Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Homma K, Okuda K, Kato T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. Oral Microbiol Immunol. 2004;19(1):61-4.

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

Tang G, Yip HK, Samaranayake LP, Luo G, Lo EC, Teo CS. *Actinomyces* spp. in supragingival plaque of ethnic Chinese preschool children with and without active dental caries. Caries Res. 2003;37(5):381-90.

Tang G, Samaranayake LP, Yip HK. Genotypic diversity of oral *Actinomyces naeslundii* genospecies 1 and 2 in caries-active preschool children. *Oral Microbiol Immunol*. 2004;19(6):371-8.

Tanzer [JM](#), [Thompson A](#), [Sharma K](#), [Vickerman MM](#), [Haase EM](#), [Scannapieco FA](#). *Streptococcus mutans* out-competes *Streptococcus gordonii* in vivo. [J Dent Res](#). 2012;91(5):513-9.

ten Cate JM. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology*. 2006;94(1):1-9.

ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, de Groot PW. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. *J Dent Res*. 2009;88(2):105-15.

Teske M, Trentini AM. *Herbarium: compêndio de fitoterapia*. 2. ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico;1995.

Thien-Fah C, Mah GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*. 2001;9(1):34-9

Thomas RZ, van der Mei HC, van der Veen MH, de Soet JJ, Huysmans MC. Bacterial composition and red fluorescence of plaque in relation to primary and secondary caries next to composite: an in situ study. *Oral Microbiol. Immunol*. 2008;23(1):7-13.

Torres CRG, Kubo CH, Anido AA, Rodrigues JR. Agentes antimicrobianos e seu potencial uso na Odontologia. *Pós-Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos*. 2000;3(2):43-52.

Twetman S. Antimicrobials in future caries control? A review with special reference to chlorhexidine treatment. *Caries Res*. 2004;38(3):223-9.

Ullsfooss BN, Ogaard B, Arends J, Ruben J, RollaG, Afseth J. Effect of a combined chlorhexidine and NaF mouthrinse: an in vivo human caries model study. *Scand J Dent Res*. 1994;102(2):109-12.

Ultee A, Ketz EP, Smid EJ. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Baccillus cereus*. Appl Environ Microbiol. 1999;65(10):4606-10.

van Houte J. Bacterial specificity in the etiology of dental caries. Int Dent J. 1980;30:305-26.

Vinholis AHC, Gonçalves PC, Marcantonio Jr EM. Mecanismo de ação da clorexidina. Periodontia. 1996;5:281-3.

Whittaker CJ. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 1996;50:513–52

World Health Organization [homepage in Internet]. Tradicional Medicine. WHO 2010 [acesso em 2010 set.]. Disponível em: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/index.html.

Yang Y, Sreenivasan PK, Subramanyam R, Cummins D. Multiparameter assessments to determine the effects of sugars and antimicrobials on a polymicrobial oral biofilm. Appl Environ Microbiol. 2006;72(10):6734-42.

Yousef RT, Tawil GG. Antimicrobial activity of volatile oils. Pharmazie. 1980;35(11):698-701.

ANEXO A - Certificado de Comitê de Ética em Pesquisas

  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028
Fax (12) 3947-9010 / janete@fosjc.unesp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Com Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **011/2011-PH/CEP**, referente ao Projeto intitulado **“Investigação das propriedades anticariogênicas de óleos essenciais: Atividade antimicrobiana, citotoxicidade e caracterização química”**, sob a responsabilidade de **CRISTIANE YUMI KOGA ITO**, tendo como orientada a aluna de Mestrado **MARIA ALCIONÉIA CARVALHO DE OLIVEIRA**, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, com 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, 12 de abril de 2011.


Profa. Adjunto JANETE DIAS ALMEIDA
Coordenadora