

**ISABELA DE OLIVEIRA CARVALHO**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÓLEOS  
ESSENCIAIS E CREMES DENTAIS FITOTERÁPICOS EM BACTÉRIAS  
CARIOGÊNICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de Magister Scientiae.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2016**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C331a  
2016  
Carvalho, Isabela de Oliveira, 1980-  
Atividade antibacteriana de óleos essenciais e cremes  
dentais fitoterápicos em bactérias cariogênicas / Isabela de  
Oliveira Carvalho. - Viçosa, MG, 2016.  
xv, 85f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador : Marisa Alves Nogueira Diaz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Referências bibliográficas: f.59-83.

1. Plantas medicinais. 2. Óleos essenciais - Análise.  
3. Fitoterapia. 4. Atividade antibacteriana. 5. Patologia oral.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de  
Pós-graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 615.321

**ISABELA DE OLIVEIRA CARVALHO**

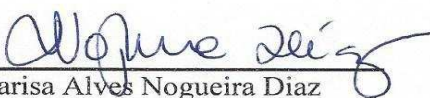
**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÓLEOS  
ESSENCIAIS E CREMES DENTAIS FITOTERÁPICOS EM BACTÉRIAS  
CARIOGÊNICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de junho de 2016.

  
\_\_\_\_\_  
Maria Aparecida Scatamburlo Moreira

  
\_\_\_\_\_  
Virginia Ramos Pizzolo  
(Coorientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Marisa Alves Nogueira Diaz  
(Orientadora)

Aos meus filhos Iran, Agatha e  
Áurea, razões do meu viver!

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a UFV e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade.

Agradeço ao Departamento de Medicina e Enfermagem por permitirem a minha liberação para cursar o mestrado.

Agradeço ao CNPq e Fapemig pelo auxílio financeiro.

Agradeço aos professores Gaspar Diaz Muñoz e Virgínia Ramos Pizzolo pela orientação e apoio.

Agradeço a Profa. Maria Aparecida Scatamburlo Moreira pelo apoio e pelas bactérias cedidas.

Agradeço a Magna Coroa do Departamento de Medicina Veterinária pela colaboração.

Agradeço aos colegas do laboratório Fernanda, Viktor, Marcos, kamilla, Fábio, Giordani e Júlia pela amizade e companheirismo.

Agradeço ao Eduardo Monteiro, secretário da Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada pelo incentivo.

Enfim, agradeço a minha orientadora querida Profa. Marisa Alves Nogueira Diaz, que me acompanhou e orientou, transmitindo-me tranquilidade e conhecimento, que se mostrou capaz de lidar com situações inesperadas e ainda assim possibilitar que o melhor fosse feito! Agradeço por ter me acolhido de braços abertos, agradeço os conselhos, agradeço por ter se mostrado sempre positiva mesmo quando eu me mostrava desanimada, agradeço pelo incentivo, agradeço por ter acreditado em mim, agradeço imensamente por tudo!

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho se tornasse realidade

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Agradeço ao meu marido Rafael pelo amor, carinho e apoio incondicional.

Agradeço a minha mãe Ilza, minha sobrinha Isis e meu irmão Caio pelo amor e incentivo.

Agradeço a minha irmã Jodieh e meu cunhado Eduardo pela colaboração e apoio dispendidos.

Agradeço ao meu amigo José Luiz do LASA (Laboratório de Síntese de Agroquímicos-UFV) pela colaboração e incentivo.

Agradeço a Dra Sâmia Lima, e a aluna de IC Gislaine Purgato pela colaboração nos testes biológicos e incentivo durante esse trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTAS DE ABREVIATURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xi
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1. Produtos naturais .....	3
2.1.1. Uso de óleos essenciais na terapêutica de microrganismos cariogênicos ...	5
2.2. Cavidade oral.....	10
2.2.1. Principais bactérias causadoras de patologias da cavidade oral.....	10
2.2.1.1. Streptococcus mutans .....	10
2.2.1.2. Lactobacillus sp.....	11
2.2.1.3. Staphylococcus aureus .....	11
2.2.1.4. Enterococcus sp.....	12
2.2.2. Biofilme dental .....	12
2.2.3. Cárie dentária .....	15
2.3. Dentifrícios e agentes antimicrobianos.....	16
2.3.1. Fluorose dental .....	17

<b>3. OBJETIVOS</b> .....	18
3.1. Objetivo Geral .....	18
3.2. Objetivos Específicos .....	18
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
4.1. Obtenção dos óleos essenciais.....	19
4.2. Microrganismos utilizados.....	20
4.2.1. Armazenamento dos microrganismos utilizados .....	20
4.3. Avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais .....	20
4.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos OEs ativos .....	21
4.5. Avaliação dos óleos essenciais ativos sobre os biofilmes bacterianos pré- formados .....	23
4.6. Avaliação da interação entre os óleos essenciais ativos e a clorexidina.....	24
4.7. Seleção e manipulação dos cremes dentais .....	25
4.8. Avaliação da atividade antibacteriana dos cremes dentais .....	27
4.9. Avaliação dos cremes dentais sobre o biofilme bacteriano pré-formado .....	27
4.10. Análises cromatográficas dos óleos essenciais .....	28
4.11. Análises Estatísticas.....	28
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	29
5.1. Avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais .....	29
5.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos OEs ativos .....	31
5.3. Avaliação dos óleos essenciais ativos sobre o biofilme bacteriano pré-formado	34
5.4. Avaliação da interação entre os óleos essenciais e a clorexidina.....	38

5.5. Avaliação da atividade antibacteriana dos cremes dentais .....	39
5.6. Avaliação dos cremes dentais sobre o biofilme bacteriano pré-formado .....	42
5.7. Análise cromatografica dos óleos essenciais .....	46
5.7.1 Cromatograma do óleo essencial <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (Canela) .....	47
5.7.2 Cromatograma do óleo essencial de <i>Eugenia caryophyllata</i> (Cravo) .....	49
5.7.3 Cromatograma do óleo essencial <i>Origanum vulgare</i> (Orégano).....	51
5.7.4 Cromatograma do óleo essencial <i>Thymus vulgaris</i> (Tomilho branco) .....	54
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>58</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>59</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>84</b>

## LISTAS DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Infusão de Cérebro e Coração Bovino
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CIB	Concentração Inibitória de Biofilme
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bacteriana Mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O.	Densidade Ótica
MTT	Ensaio de Metiltiazol
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
OE	Óleo Essencial
OMS	Organização Mundial de saúde

## LISTA DE FIGURAS

	PÁGINAS
<b>Figura 1</b> Etapas de desenvolvimento do biofilme.....	13
<b>Figura 2</b> Cárie precoce da infância.....	15
<b>Figura 3</b> Graus leve, moderado e severo da fluorose dentária.....	18
<b>Figura 4</b> Esquema da Placa de ELISA para determinação da CIM, Poços com coloração amarela possuem bactérias mortas e poços com coloração azul bacteriais metabolicamente ativas.....	23
<b>Figura 5</b> Esquema de diluições das amostras nos poços após as diluições seriadas de clorexidina e óleos essenciais para o método de checkerboard. Concentrações de clorexidina em azul e do óleo em laranja.....	25
<b>Figura 6</b> Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de alecrim (1), canela (2), elaleuca (3), noz moscada (4), cravo (5) gengibre (6), laranja (7), orégano (8), tomilho (9) frente as bactérias <i>Lactobacillus</i> sp. (A) <i>Enterococcus</i> sp. (B) <i>Streptococcus mutans</i> (C) <i>Staphylococcus aureus</i> (D)..	29
<b>Figura 7</b> Halos de inibição (milímetros) dos óleos essenciais de <i>C. zeylanicum</i> (2), <i>E. caryophyllata</i> (5), <i>O. vulgare</i> (8), <i>T. vulgaris</i> (9) e controle positivo (clorexidina) para as bactérias <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus</i> sp. e <i>Lactobacillus</i> sp.....	30
<b>Figura 8</b> Porcentagem de inibição dos óleos essenciais de <i>C. zeylanicum</i> (2), <i>E. caryophyllata</i> (5), <i>O. vulgare</i> (8) e <i>T. vulgaris</i> (9) sobre o biofilme pré-formado de <i>Streptococcus mutans</i> utilizando valores de CIM (concentração inibitória mínima).....	34
<b>Figura 9</b> Porcentagem de inibição dos óleos essenciais de <i>C. zeylanicum</i> (2), <i>E. caryophyllata</i> (5), <i>O. vulgare</i> (8) e <i>T. vulgaris</i> (9) sobre o biofilme pré-formado de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando valores de CIM (concentração inibitória mínima).....	35
<b>Figura 10</b> Porcentagem de inibição dos óleos essenciais de <i>C. zeylanicum</i> (2), <i>E. caryophyllata</i> (5), <i>O. vulgare</i> (8) e <i>T. vulgaris</i> (9) sobre o biofilme pré-formado de <i>Enterococcus</i> sp. utilizando valores de CIM (concentração inibitória mínima).....	35

<b>Figura 11</b> Médias dos halos de inibição (milímetros) dos cremes dentais a 3% e 5% frente à bactéria <i>Streptococcus mutans</i> : <i>C. zeylanicum</i> (2), <i>E. caryophyllata</i> (5), <i>O. vulgare</i> (8), <i>T. vulgaris</i> (9).....	39
<b>Figura 12</b> Médias dos halos de inibição (milímetros) dos cremes dentais a 3% e 5% frente à bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> : <i>C. zeylanicum</i> (2), <i>E. caryophyllata</i> (5), <i>O. vulgare</i> (8), <i>T. vulgaris</i> (9).....	40
<b>Figura 13</b> Médias dos halos de inibição (milímetros) dos cremes dentais a 3% e 5% frente à bactéria <i>Lactobacillus</i> sp: <i>C. zeylanicum</i> (2), <i>E. caryophyllata</i> (5), <i>O. vulgare</i> (8), <i>T. vulgaris</i> (9).....	41
<b>Figura 14</b> Médias dos halos de inibição (milímetros) dos cremes dentais a 3% e 5% frente à bactéria <i>Enterococcus</i> sp: <i>C. zeylanicum</i> (2), <i>E. caryophyllata</i> (5), <i>O. vulgare</i> (8), <i>T. vulgaris</i> (9).....	41
<b>Figura 15</b> Porcentagem de inibição dos cremes dentais a 3% e 5% sobre o biofilme pré-formado de <i>Streptococcus mutans</i> : <i>C. zeylanicum</i> (2), <i>E. caryophyllata</i> (5), <i>O. vulgare</i> (8), <i>T. vulgaris</i> (9).....	43
<b>Figura 16</b> Porcentagem de inibição dos cremes dentais a 3% e 5% sobre o biofilme pré-formado de <i>Staphylococcus aureus</i> : <i>C. zeylanicum</i> (2), <i>E. caryophyllata</i> (5), <i>O. vulgare</i> (8), <i>T. vulgaris</i> (9).....	43
<b>Figura 17</b> Porcentagem de inibição dos cremes dentais a 3% e 5% sobre o biofilme pré-formado de <i>Enterococcus</i> sp.: <i>C. zeylanicum</i> (2), <i>E. caryophyllata</i> (5), <i>O. vulgare</i> (8), <i>T. vulgaris</i> (9).....	44
<b>Figura 18</b> Cromatograma do óleo essencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> ....	47
<b>Figura 19</b> Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de <i>C. zeylanicum</i> .....	47
<b>Figura 20</b> Cromatograma do óleo essencial de <i>Eugenia caryophyllata</i> .....	49
<b>Figura 21</b> Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de <i>E. caryophyllata</i> .....	49
<b>Figura 22</b> Cromatograma do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> .....	51
<b>Figura 23</b> Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de <i>O. vulgare</i> .....	52
<b>Figura 24</b> Cromatograma do óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> .....	54
<b>Figura 25</b> Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> .....	54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Nome comum, nome científico, uso na medicina alternativa e principais constituintes de noz moscada, alecrim, canela, cravo da índia, melaleuca, gengibre, orégano, tomilho, laranja, tangerina, lima, eucalipto limão e hortelã pimenta.....	07
<b>Tabela 2</b> Identificação dos óleos essenciais utilizados.....	19
<b>Tabela 3</b> Composição e quantidade dos componentes usados na formulação dos cremes dentais à base dos óleos essenciais ativos.....	26
<b>Tabela 4</b> Concentração Inibitória Mímina (CIM) dos óleos essenciais ativos frente as bactérias <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Lactobacillus sp</i> e <i>Enterococcus sp</i> .....	32
<b>Tabela 5</b> Interação entre os óleos essenciais ativos e a clorexidina sobre <i>Streptococcus mutans</i> .....	38
<b>Tabela 6</b> Principais componentes dos óleos essenciais estudados.....	46
<b>Tabela 7</b> Principais componentes encontrados no óleo essencial de <i>C. zeylanicum</i> .....	47
<b>Tabela 8</b> Principais componentes encontrados no óleo essencial de <i>E. caryophyllata</i> .....	49
<b>Tabela 9</b> Principais componentes encontrados no óleo essencial de <i>O. vulgare</i> .....	51
<b>Tabela 10</b> Principais componentes encontrados no óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> .....	54

## RESUMO

CARVALHO, Isabela de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Junho de 2016. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e cremes dentais fitoterápicos em bactérias cariogênicas.** Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz. Coorientadores: Gaspar Diaz Muñoz e Virgínia Ramos Pizziolo.

As plantas vêm sendo utilizadas pela população para várias finalidades, porém muitas não têm ação comprovada. Desta forma, pesquisas que buscam identificar produtos naturais com atividade biológica representam uma alternativa para tratamento de doenças, entre elas infecções bacterianas. O uso de fitoterápicos tem sido uma opção terapêutica dos profissionais de saúde que procuram novas alternativas com potencial atividade farmacológica, menor toxicidade e menores custos a população. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme de treze óleos essenciais (canela, cravo, orégano, tomilho, laranja, lima, tangerina, eucalipto, hortelã, noz moscada, alecrim, gengibre e melaleuca) puros e incorporados a cremes dentais frente a bactérias causadoras de patologias na cavidade oral. Foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus* sp. e *Enterococcus* sp. Inicialmente foi realizado o teste de difusão em ágar e apenas os óleos de *C. zeylanicum* (canela), *E. caryophyllata* (cravo), *O. vulgare* (orégano) e *T. vulgaris* (tomilho) apresentaram atividade antibacteriana. O teste de concentração inibitória mínima (CIM) foi realizado com os óleos essenciais ativos sendo observada uma potente atividade do óleo de *C. zeylanicum* contra a bactéria *S. mutans* (0,156 mg/mL). A seguir, os óleos essenciais foram testados para verificar a atividade antibiofilme tendo o óleo de *E. caryophyllata* apresentado atividade contra o biofilme de *S. mutans* de 39% a 44%, os quatro óleos ativos inibindo o biofilme de *S. aureus* de 92% a 95% e o óleo de *O. vulgare* apresentado atividade contra o biofilme de *Enterococcus* sp. de 43% a 60%. Posteriormente os óleos ativos foram incorporados a cremes dentais nas concentrações de 3% e 5%, puros e em associações, totalizando 18 cremes dentais fitoterápicos. O teste de difusão em ágar foi utilizado para verificar a atividade antibacteriana dos cremes dentais sendo observadas atividades significativas nas duas concentrações utilizadas. Os cremes dentais também foram submetidos ao teste de inibição do biofilme pré-formado, sendo verificado que para a bactéria *S. mutans* a

associação dos quatro óleos essenciais inibiu 100% do biofilme. Para *S. aureus* 12 dos 18 cremes dentais inibiram em mais de 50% do seu biofilme e para *Enterococcus* sp. todos os cremes dentais obtiveram mais de 45% de ação. No presente estudo também foi observado o sinergismo entre a clorexidina e o óleo essencial de *T. vulgaris* para bactéria *S. mutans*. Os óleos ativos foram submetidos a cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa para elucidação dos componentes majoritários. Assim, os óleos essenciais de canela, cravo, tomilho e orégano e os cremes dentais fitoterápicos utilizados no presente estudo apresentaram atividade antibacteriana e antibiofilme contra bactérias cariogênicas, sendo, portanto, uma alternativa para a prevenção e terapia das doenças da cavidade oral.

## ABSTRACT

CARVALHO, Isabela de Oliveira, MSc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2016. **Antibacterial activity of essential oils and herbal toothpastes against cariogenic bacteria.** Adviser: Marisa Alves Nogueira Diaz. Co-advisers: Gaspar Diaz Muñoz and Virgínia Ramos Pizziolo.

Plants have been used throughout human history for various therapeutic purposes. However, for many of these plants, the supposed medicinal activities have not been proven. Thus, studies toward the identification of bioactive plant metabolites constitutes a promising alternative for the treatment of diseases, including bacterial infections. Due to the potential pharmacological activities, low toxicity, and lower costs, herbal medicines have been used by health professional as an alternative to synthetic drugs. The objective of the present work was to evaluate the antibacterial and biofilm inhibition activities of thirteen essential oils (cinnamon, cloves, oregano, thyme, orange, lime, tangerine, eucalyptus, mint, nutmeg, rosemary, ginger, and melaleuca), both in pure forms and incorporated into toothpastes, against bacteria causative of pathologies of oral cavity. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus* sp. and *Enterococcus* sp. Were used in this study. In the preliminary investigations, results from agar diffusion tests showed that only *C. zeylanicum* (cinnamon), *E. caryophyllata* (clove), *O. vulgare* (oregano), and *T. vulgaris* (thyme) showed antibacterial activity. These oils were tested to determine their minimal inhibitory concentration (MIC), and a potent antibacterial activity was observed for *C. zeylanicum* against *S. mutans* (0.156 mg/mL). Following, the essential oils were tested for their biofilm inhibition activities. *E. caryophyllata* oil inhibited *S. mutans* biofilm from 39% to 44%. The four active oils inhibited *S. aureus* biofilm from 92% to 95%, and *O. vulgare* oil inhibited *Enterococcus* sp. biofilm from 43% to 60%. Following, the active essential oils were incorporated in toothpastes at concentrations of 3% and 5%, pures and in associations, totalizing 18 herbal toothpastes. All these toothpastes showed significant activities at both concentrations tested. Toothpaste containing association of the four active oils inhibited by 100% the formation of biofilm by *S. mutans*. Twelve of the eighteen toothpastes were capable of inhibiting *Enterococcus* sp. biofilm in 50 %, and all formulations showed more than 45% of

inhibition. In these studies, a synergistic action between chlorhexidine and *T. vulgaris* against *S. mutans* was observed. Finally, the active oils were analysed by gas Chromatography-Mass spectrometry and their major chemical constituents were identified. In conclusion, the essential oils of cinnamon, cloves, thyme, and oregano, as well as the herbal toothpastes containing these essential oils, showed antibacterial activities against cariogenic bacteria, indicating their potential as alternative to treatment and prevention of diseases of oral cavity.

## 1. INTRODUÇÃO

A cavidade oral abriga uma vasta gama de microrganismos, com prevalência de bactérias, que se aderem as superfícies dos dentes e produzem grandes quantidades de matriz extracelular para formar biofilmes (Zaura et al., 2009; Marsh et al., 2011). Os biofilmes são estruturas complexas e dinâmicas que conferem uma maior proteção às bactérias contra os agentes antibacterianos devido ao maior potencial de virulência e resistência físicoquímica encontrados nesses ambientes (Pitss et al., 2003). A presença de biofilme dental pode desencadear doenças como a cárie dentária, gengivite e periodontite que são consideradas problemas de saúde pública e representam as doenças da cavidade oral mais prevalentes do mundo (Novais et al., 2004; Pihlstrom et al., 2005; Bowenand & Koo 2011; Susin et al., 2014).

A maneira mais eficaz para a prevenção e remoção do biofilme dental corresponde a remoção mecânica com a utilização de produtos de higiene oral como cremes dentais e enxaguatórios bucais que possuem em sua formulação ingredientes antibacterianos como triclosan, flúor, cloreto de cetilpiridínio e clorexidina, os quais reduzem eficazmente a concentração de bactérias da boca contribuindo para a saúde bucal. No entanto, essas substâncias podem causar efeitos colaterais como pigmentação no esmalte dos dentes, perda do paladar e são contra indicadas para crianças, devido ao desenvolvimento da resistência microbiana, mudanças indesejadas na ecologia oral e a fluorose dental, que é caracterizada pela presença de manchas nos dentes, devido ao excesso de ingestão de flúor (Villena & Corrêa, 1998; Waraswapati et al., 2005; Passariello et al., 2014).

O emprego de produtos naturais com efeito antibacteriano em produtos de higiene oral podem reduzir o risco desses problemas bucais e ser um complemento útil na manutenção saúde. Os cremes dentais naturais são aqueles sem triclosan ou fluoreto e geralmente contêm ingredientes como extratos de plantas e óleos essenciais (Jyoti et al., 2009; Signoretto et al., 2011).

O Brasil conta com uma grande diversidade vegetal e estudos com plantas medicinais são importantes para a abertura de novos caminhos terapêuticos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) indica que 85% da população de países em desenvolvimento fazem uso de plantas medicinais e a associação dessas plantas com produtos de higiene bucal pode ser benéfico à população devido as atividades antibacterianas apresentadas por produtos naturais como os óleos essenciais (Takarada et al., 2004; OMS, 2005; Azevedo & Silva, 2006).

Atualmente, óleos essenciais e extratos de plantas tem sido incorporados a produtos de higiene oral (Stoeken et al., 2007; Allaker & Douglas 2009; Chen et al., 2014; Cortelli et al., 2014; Chalhoub et al., 2016), e esses produtos apresentam menor toxicidade em comparação com os produtos contendo compostos sintéticos como triclosan, cloreto de cetilpiridínio, clorexidina e fluoreto (Okpalugo et al., 2009; Kamatou et al., 2013).

Diante do exposto, pesquisas que buscam produtos naturais eficazes na prevenção e controle das patologias da cavidade oral são importantes para uma melhor qualidade de vida. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos antibacterianos e antibiofilme de óleos essenciais puros e incorporados a cremes dentais frente a bactérias causadoras de patologias da cavidade oral.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Produtos naturais**

Um produto natural é um composto químico ou substância produzida por um ser vivo e que geralmente apresenta atividade biológica. As plantas têm capacidade de biossintetizar produtos naturais, entre eles óleos essenciais, que são produzidos pelo metabolismo secundário e que apresentam ampla diversidade estrutural e biológica. O metabolismo secundário origina metabólitos encontrados em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas e embora não sejam essenciais para que a planta complete seu ciclo de vida, garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação da espécie (Simões et al., 2004; Zandi-Sohani & Ramezani, 2015). Os metabólitos secundários dividem-se em três grandes grupos: terpenos, que são derivados do ácido mevalônico e formados por unidades isoprênicas, compostos fenólicos derivados dos fenilpropanóides e alcalóides que são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina) e aminoácidos alifáticos como ornitina e a lisina (Peres, 2004).

As plantas representam uma grande fonte de compostos bioativos sendo promissoras para a indústria de medicamentos e cosméticos, com grande potencial na geração de novos produtos de interesse da sociedade (Atanasov et al., 2015; Zandi-Sohani & Ramezani, 2015). Segundo Carvalho e colaboradores (2007), aproximadamente 48% dos medicamentos comercializados têm origem direta ou indireta de produtos naturais, principalmente a partir das plantas.

Óleos essenciais (OEs) são produtos do metabolismo secundário responsáveis pelo odor ou sabor característico das plantas (Retta et al., 2012) e correspondem a misturas de compostos lipossolúveis, voláteis (baixo peso molecular), como monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides, e com densidades geralmente menores do que a água (Rubiolo et al., 2010; Alimpić et al., 2015), facilmente se difundem através da parede celular, o que facilita sua penetração e as interações com seu sítio de ação (Zarrad et al., 2015). Esses compostos são obtidos principalmente por hidrodestilação ou arraste de vapor (Ye et al., 2015) e o primeiro óleo essencial foi desenvolvido na idade média pelos árabes (Abad et al., 2007; Sertkaya et al., 2010).

Os OEs apresentam coloração levemente amarelada ou até incolor e são utilizados principalmente para proteção e atração de polinizadores (Radünz et al., 2003; Oliveira et al., 2006). Podem ser sintetizados por toda a planta como em brotos,

flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutos, raízes, madeira ou cascas e armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células da epiderme ou em tricomas glandulares (Burt, 2004; Andrade et al., 2014). As análises químicas dos óleos essenciais podem ser obtidas principalmente por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, sendo que alguns óleos apresentam mais de 60 compostos diferentes (Galindo et al., 2010).

Como constituintes dos OEs existem uma ou várias substâncias em maior quantidade denominados compostos majoritários, geralmente determinam as propriedades biológicas desses produtos naturais (Cabral et al., 2015). Os componentes dos óleos essenciais são de dois grupos de origem biossintética, o principal grupo corresponde a terpenos e terpenóides e o outro a fenilpropanóides (Simões et al., 2007; Bi et al., 2016). A maioria desses compostos vem, principalmente, de plantas das famílias Lamiaceae (manjeriço, tomilho), Myrtaceae (cravo), Piperaceae (pimenta-preta), Rutaceae (limão, laranja), Zingiberaceae (gingibre) que são conhecidas como especiarias aromáticas e pelo uso medicinal e na indústria alimentícia (Soares & Tavares-Dias, 2013; Bukvički et al., 2014; Silva & Domingues, 2015; Basappa et al., 2015).

O teor de constituintes dos OEs são influenciados por diferentes fatores ambientais tais como temperatura, altitude, sazonalidade, índice pluviométrico, composição atmosférica, herbivoria, disponibilidade de água entre outros (Radünz et al., 2003; Oliveira et al., 2006; Gobbo-Netto & Lopes, 2007). Tem sido relatado na literatura que existe uma relação entre a composição química dos óleos essenciais e a atividade antimicrobiana, sendo os compostos fenólicos como eugenol, cinamaldeído, carvacrol e timol citados como apresentando altos níveis de atividade (Baydar et al., 2004).

Sabe-se que cerca de 35% dos óleos essenciais estudados exibem propriedades antimicrobianas e a atividade antibacteriana pode ocorrer pela desestabilização da parede celular, aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática e pela alteração de vários sistemas enzimáticos, incluindo aqueles envolvidos na produção de energia celular e na síntese de componentes estruturais (Burt, 2004; Oliveira et al., 2006; Delamare et al., 2007; Donato et al., 2015). Existem diversos produtos naturais empregados em abordagens terapêuticas e entre eles os óleos essenciais são descritos como produtos com grande potencial terapêutico e farmacológico (Vlase et al., 2014; Duarte et al., 2016).

A fitoterapia é considerada um recurso terapêutico no qual produtos naturais

são utilizados como base da terapia medicamentosa e esses produtos são considerados uma das maiores fontes para a descoberta de novos medicamentos com atividade antibacteriana, antifúngica e antineoplásica (Lima Junior & Dimenstein, 2006; David et al., 2015). Na atualidade, podemos observar uma atenção especial dada ao estudo científico dos fitoterápicos com o objetivo de se buscar recursos que permitam uma atividade sustentável (Baby et al., 2005). O aumento do uso das plantas pode ser explicado pelo avanço ocorrido na área científica que permitiu o desenvolvimento de fitoterápicos confiáveis e eficazes. Porém, ainda faltam estudos científicos que comprovem a utilização segura e eficaz de várias plantas (Ribeiro et al., 2005; Vieira et al., 2010).

Os produtos fitoterápicos possuem ação mais branda que os medicamentos alopáticos já que princípio ativo da planta não é utilizado de maneira isolada, atuando em conjunto com outras substâncias presentes nas plantas. Esse conjunto de elementos é chamado de fitocomplexos e são responsáveis pelo efeito terapêutico e pela redução dos efeitos colaterais (Bara, 2006).

### **2.1.1. Uso de óleos essenciais na terapêutica de microrganismos cariogênicos**

O uso de plantas para o tratamento de problemas dentários tem sido discutido ao longo do tempo por muitos pesquisadores e muitas culturas ainda usam partes de plantas para tratamento de doenças orais como cáries, limpeza e escovação dos dentes, principalmente em zonas rurais de países subdesenvolvidos (Neumegen et al., 2005; Benso et al., 2015).

O interesse pelas plantas para investigações de novos compostos antibacterianos é devido à variedade de substâncias químicas pertencentes à diferentes classes de metabólitos secundários, tais como as antraquinonas, flavonóides, terpenóides, alcalóides e taninos, que podem agir também como antioxidantes, anti-inflamatórios, antifúngicos entre outras atividades biológicas (Moschonas et al., 2015).

O início da utilização de produtos vegetais para fins terapêuticos no homem é tão antigo quanto a sua própria história e o uso inicialmente empírico de plantas foi sendo substituído pela experimentação de suas propriedades químicas e terapêuticas, desta forma, a medicina baseada em produtos naturais é utilizada para o tratamento de várias doenças (De Vos, 2010).

As plantas medicinais estão sendo cada vez mais utilizadas para o tratamento de doenças infecciosas, visando diminuir as desvantagens trazidas pelo uso de





antimicrobianos tal como a resistência bacteriana. Os óleos essenciais correspondem a forma de apresentação que concentra a maior quantidade de fitoconstituintes com propriedades biológicas ativas (Costa et al., 2009; Pozzatti et al., 2009), o que justifica a sua aplicabilidade nas indústrias de cosméticos e alimentos (Moschonas et al., 2015).





Na área odontológica, observa-se o aumento da utilização de plantas medicinais que possuem atividade antibacteriana para prevenir a formação do biofilme dental, contribuindo para a redução da cárie dentária e de doenças periodontais (Pereira et al., 2005). Estudos buscando identificar produtos naturais com atividade biológica têm sido realizados visando à obtenção de agentes antibacterianos que possibilitem a prevenção e tratamento de afecções da cavidade oral (Burt, 2004; Vasconcelos et al., 2008) e os produtos de higiene oral que contém óleos essenciais em sua formulação alcançaram alto nível de potencialidade antimicrobiana, aumentando o interesse pelos agentes antibacterianos naturais (Filoche et al., 2005).




De acordo Fine e colaboradores (2007), compostos presentes nos óleos essenciais tais como mentol, timol, eucaliptol têm sido incorporados a produtos de higiene oral e estes produtos podem reduzir os níveis de placa dentária e gengivite em ensaios clínicos.

Na tabela abaixo (Tabela 1), estão descritas as plantas que contém óleos essenciais utilizados no presente estudo.

**Tabela 1** Nome comum, nome científico, uso na medicina alternativa e principais constituintes de noz moscada, alecrim, canela, cravo da índia, melaleuca, gengibre, orégano, tomilho, laranja, tangerinana, lima, eucalipto limão e hortelã pimenta

Nome comum	Nome científico	Uso na medicina alternativa	Principais constituintes	Referencias bibliográficas
<p>Noz moscada</p> 	<p><i>Myristica fragrans</i>, Houtt</p>	<p>antitrombótico, antifúngico, antiemético, antiácido, antiinflamatório</p>	<p><math>\alpha</math>-pineno, <math>\beta</math>-pineno, ácido mirístico, macelignan</p>	<p>Qiu et al., 2004; Chung et al., 2006; Yang et al., 2008; Jaiswal et al., 2009; Zaidi et al., 2009; <a href="http://www.demonchyaromatics">http://www.demonchyaromatics</a>.</p>
<p>Alecrim</p> 	<p><i>Rosmarinus officinalis</i>, Linn.</p>	<p>anti-hipertensivo, hipoglicemiante, antibacteriano</p>	<p>cineol, <math>\alpha</math>-pineno, canfora</p>	<p>Porte &amp; Godoy, 2001; Agra et al., 2007; <a href="http://www.ayhhed.com/">http://www.ayhhed.com/</a></p>
<p>Canela</p> 	<p><i>Cinnamomum zeylanicum</i>, Blume</p>	<p>analgésico, antiespasmódico, afrodisíaco, antibacteriano</p>	<p><math>\alpha</math>-terpineno, limoneno, cinamaldeído, eugenol</p>	<p>Lima et al., 2005; Gayoso et al., 2005; <a href="http://www.sundayobserver.lk/">http://www.sundayobserver.lk/</a></p>
<p>Cravo da índia</p> 	<p><i>Eugenia caryophyllata</i>, Thunb</p>	<p>antifúngico, antibacteriano, anestésico, analgésico</p>	<p>eugenol, <math>\alpha</math>- pineno, <math>\beta</math>-pineno, p-cimeno, limoneno, linalol</p>	<p>Lima et al., 2006; Matan et al.,2006; Carvalho et al., 2009; Costa et al., 2009; <a href="http://www.orvosok.hu/">http://www.orvosok.hu/</a></p>

<p>Melaleuca</p> 	<p>Melaleuca alternifolia, Cheel</p>	<p>antibacteriano</p>	<p>terpinen-4-ol, γ-terpieno, α-terpieno, 1,8 cineol, α-pineno</p>	<p>Cox et al., 2001; Hammer, 2003; Carson et al., 2006; <a href="http://www.isolebrissago.ch/en/botanic-garden/botanical-cards/myrtaceae/162-myrtaceae">http://www.isolebrissago.ch/en/botanic-garden/botanical-cards/myrtaceae/162-myrtaceae</a></p>
<p>Gengibre</p> 	<p>Zingiber officinale, R.</p>	<p>tratamento de artrite, reumatismo, doenças cardiovasculares</p>	<p>geranial, neral, α- zingibereno, ar-curcumeno</p>	<p>Singh et al., 2008; Tuntiwechapikul et al., 2010; Rodrigues &amp; Lira, 2013; <a href="http://theida.com/beloved-ginger">http://theida.com/beloved-ginger</a></p>
<p>Orégano</p> 	<p>Origanum vulgare, L.</p>	<p>antibacteriano, antifúngico, antiparasitário</p>	<p>timol, sabineno, terpineol, cariofileno, carvacrol</p>	<p>Baydar et al., 2004; Shafaghat, 2011; <a href="http://incontinenciacultural.blogspot.com.br">http://incontinenciacultural.blogspot.com.br</a></p>
<p>Tomilho</p> 	<p>Thymus vulgaris, L.</p>	<p>antibacteriano, antifúngico, antiviral, antisséptico</p>	<p>carvacrol, timol</p>	<p>Meister et al., 1999; Hudaib et al., 2002; Bukovska et al., 2007; Maksimovic et al., 2008; Dal Pozzo et al., 2011; <a href="https://commons.wikimedia.org/wiki/">https://commons.wikimedia.org/wiki/</a></p>

<p>Laranja doce</p> 	<p>Citrus sinensis, L.</p>	<p>antioxidante, antitumoral, ansiolítico, anticonvulsivante, antibacteriano</p>	<p>limoneno</p>	<p>Choi et al., 2000; Callaway et al., 2011; Gaínza et al., 2015; <a href="https://en.wikipedia.org/wiki/Orange_(fruit)">https://en.wikipedia.org/wiki/Orange_(fruit)</a></p>
<p>Tangerina</p> 	<p>Citrus reticulata, Blanco</p>	<p>antioxidante, antimetastásica</p>	<p>limoneno, c-terpineno, β-mirceno, α-pineno, β-pineno, terpinoleno</p>	<p>Tao et al., 2014; Chang et al., 2015; <a href="http://florawww.eeb.uconn.edu/198900086.htm">http://florawww.eeb.uconn.edu/198900086.htm</a> 1</p>
<p>Lima comum</p> 	<p>Citrus aurantifolia, Swingle</p>	<p>antioxidante, analgésico, antimicrobiano, anti-helmíntico, antineoplásico</p>	<p>Limoneno</p>	<p>Manners, 2007; Patila et al., 2010; Vadehtin &amp; Vahit, 2010; Procházková et al., 2011; Khan &amp; Huma, 2014; <a href="http://gernot-katzers-spice-pages.com/engl/citr_aur.html">http://gernot-katzers-spice-pages.com/engl/citr_aur.html</a></p>
<p>Eucalipto-Limão</p> 	<p>Eucalyptus citriodora, Hook</p>	<p>analgésico, anti-inflamatório, antitérmico</p>	<p>α-pineno, 1,8-cineol, pinocarveol-trans</p>	<p>Silva et al., 2003; Khaled et al., 2015; <a href="http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?">http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?</a></p>
<p>Hortelã- pimenta</p> 	<p>Mentha piperita, L</p>	<p>antiespasmódico, antiemético, analgésico</p>	<p>mentol, mentona, 1,8-cineol, pulegona, acetato de mentila</p>	<p>Grigoleit &amp; Grigoleit, 2005; McKay &amp; Blumberg 2006; Valmorbidia et al., 2006; <a href="https://en.wikipedia.org/wiki/Peppermint">https://en.wikipedia.org/wiki/Peppermint</a></p>

## **2.2. Cavidade oral**

A cavidade oral é um ambiente altamente favorável à colonização e crescimento de uma vasta gama de microrganismos, do qual as bactérias são as mais comuns (Aas et al., 2005; Zaura et al., 2009). A presença desses microrganismos é essencial para o desenvolvimento normal da fisiologia da cavidade oral onde os mesmos contribuem para a prevenção do estabelecimento de microrganismos patogênicos (Marsh et al., 2011).

A maioria das espécies de microrganismos encontradas na cavidade oral são comensais, porém alguns deles possuem um papel bem estabelecido na etiologia da periodontite e da cárie dentária (Meyer & Taylor 1998). Esses microrganismos também têm sido implicados na etiologia de doenças sistêmicas como infecções no sistema respiratório, endocardite infecciosa entre outras (Barrau et al., 2004).

Doenças da cavidade oral podem ser controladas por uma higiene oral eficiente. No entanto, a maioria dos indivíduos tem dificuldade em manter os padrões necessários de controle da placa por períodos prolongados. Consequentemente, muitos produtos para cuidados orais são formulados para auxiliar no controle da placa dental (Scheie & Petersen, 2008).

### **2.2.1. Principais bactérias causadoras de patologias da cavidade oral**

#### **2.2.1.1. Streptococcus mutans**

Um dos principais gêneros envolvidos na formação da placa dental corresponde ao gênero *Streptococcus*, com especial referência à espécie *S. mutans*, (Katsura et al., 2001; Bueno-Silva et al., 2013) que são bactérias Gram-positivas agrupadas aos pares ou em cadeias e requerem meios nutricionalmente ricos para seu crescimento. Possui a superfície dentária como o único habitat natural conhecido e não são encontrados na cavidade bucal antes da erupção dos dentes (Gold et al., 1973; Canetti et al., 2006; Marinho & Araujo, 2007).

*Streptococcus mutans* está entre os principais patógenos relacionados ao surgimento da cárie devido ao fato de terem sido isolados em um grande

número de indivíduos acometidos por essa patologia. Além disso, está diretamente envolvido na formação de biofilmes bacterianos cariogênicos (Marsh & Martin, 1992).

Isolados de *Streptococcus mutans* são anaeróbios facultativos e sua temperatura ótima de crescimento é de 37 °C (Gold et al., 1973). Essas bactérias propiciam, devido ao seu metabolismo, um nicho acidogênico que extrapola a capacidade tampão da saliva, desencadeando alterações na camada mineral da superfície dentária e provocando a desmineralização progressiva do esmalte (Grönroos, 2000). A capacidade de colonização da superfície do dente e iniciação da formação de placa ocorre devido a capacidade dessas bactérias de sintetizarem polissacarídeos extracelulares (Haraguchi et al., 2000).

#### **2.2.1.2. *Lactobacillus* sp.**

O gênero *Lactobacillus* que possui cerca de 80 espécies representa o grupo mais numeroso de bactérias que habitam superfícies das mucosas em seres humanos, incluindo a cavidade oral. São geralmente vistos como conferindo efeitos biológicos benéficos para o hospedeiro, porém, na cavidade oral, são frequentemente associadas ao surgimento de cárie (Satokari et al., 2003; Badet & Thebaud, 2008).

Bactérias do gênero *Lactobacillus*, como as espécies *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* e *L. salivarius* não possuem capacidade de aderência à superfície dentária, estando associadas à progressão da lesão cáriosa. Essas bactérias produzem ácidos que causam desmineralização do esmalte dos dentes e podem invadir lesões cárias, contribuindo para a progressão destas lesões (Leites et al., 2006; Paradela et al., 2007; Aas et al., 2008). *Lactobacillus* são considerados colonizadores secundários no processo de formação da cárie. Em adultos são predominantes em lesões avançadas e em crianças são encontrados, mas não como o gênero predominante (Tanzer et al., 2001; Becker et al., 2002; Chhour et al., 2005).

#### **2.2.1.3. *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* é um microrganismo que pode ser um comensal ou um agente patogênico oportunista potencialmente letal em seres humanos.

Representa uma das causas mais comuns de bacteremia (Melzer & Welch, 2013) e os seres humanos estão frequentemente expostos a essa bactéria, sendo o interior das narinas o principal reservatório. Locais de colonização extranasais incluem pele, garganta, períneo, vagina, e trato gastrointestinal (Bourgeois-Nicolaos et al., 2010).

Algumas infecções orais como parotidite e mucosite estafilocócica podem ser causadas por *S. aureus* e, além disso, há evidências que sugerem que os mesmos podem ser frequentemente isolados da cavidade oral de indivíduos saudáveis, porém são mais frequentes em grupos específicos como idosos e crianças (Smith et al., 2003; Ohara-Nemoto et al., 2008).

#### **2.2.1.4. Enterococcus sp.**

O gênero *Enterococcus* possui aproximadamente 43 espécies, porém apenas algumas são importantes patógenos humanos. As espécies mais comumente isoladas e clinicamente importantes são *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (Holzapfel & Wood, 2014).

*Enterococcus faecalis*, um microrganismo com grande capacidade de formar biofilmes, é frequentemente isolado na cavidade oral e se encontra presente na maioria dos canais dentários que necessitam de retratamento (Portenier et al., 2003; Ran et al., 2015). *E. faecalis* não é considerado como parte da microbiota oral normal porém tem sido encontrado em doenças comuns como periodontite e cárie e tem demonstrado alta capacidade de penetrar nos túbulos dentinários (Aas et al., 2005; Paradella et al., 2007; Rams et al., 2013).

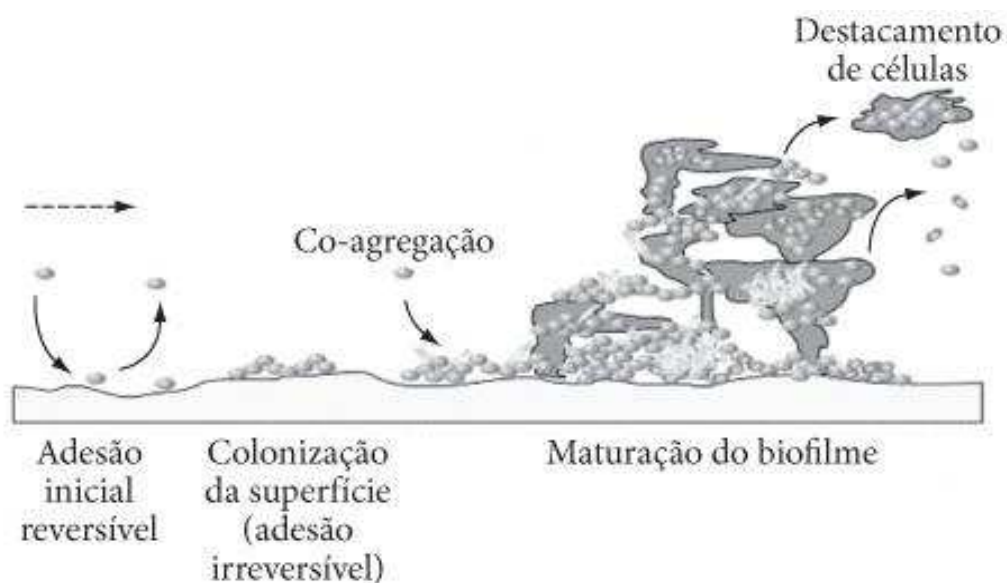
#### **2.2.2. Biofilme dental**

A cavidade oral é um ambiente heterogêneo em relação à disponibilidade de nutrientes e condições físico-químicas, assim diferentes comunidades bacterianas podem formar biofilmes dentais, também conhecidos como placa dentária (Ledder et al., 2010). A formação de biofilme é um processo natural no ambiente oral mas deve ser controlado por meio da escovação regular, a fim de impedir o desenvolvimento de bactérias

patogênicas no biofilme, que produzem metabolitos ácidos que causam desmineralização do dente, o que leva a cárie dentária e outras doenças (Marsh et al., 2011).

A placa dentária tem sido descrita como uma estrutura ordenada onde colonizadores primários como espécies de *Streptococcus* inicialmente aderem à película que envolve o dente, tornando as condições do meio adequadas para colonização de bactérias mais exigentes e após, colonizadores secundários se aderem para formar micro-ambientes ecológicos. Os organismos ligados sintetizam exopolímeros tais como glucanos, que formam a matriz do biofilme. A comunicação entre os microorganismos durante o processo de formação do biofilme ocorre através da liberação de moléculas sinalizadoras por um mecanismo denominado quorum sensing, onde essas moléculas são detectadas por receptores específicos o que permite que as células bacterianas identifiquem o tamanho da população por meio da concentração de sinais (Kolenbrander, 1988; Bradshaw et al., 1998; Rumjanek et al., 2004; Jakubovics, 2010; Peterson et al., 2011).

De acordo com Jenkinson & Lappin-Scott, (2001) as etapas para a formação de biofilmes correspondem às adesões iniciais, onde os microrganismos passam do estado planctônico ao sésil, formação de microlônias, maturação do biofilme e o destacamento de células, como representando na figura abaixo (Figura 1).



**Figura 1** Etapas de desenvolvimento do biofilme (Jenkinson & Lappin-Scott, 2001).

Os biofilmes são compostos basicamente por glicoproteínas e polissacarídeos, sendo mais tolerantes a agentes antimicrobianos, stress físicos e defesas do hospedeiro. Alguns mecanismos podem explicar o aumento da resistência dos biofilmes entre eles a restrição da difusão dos agentes antimicrobianos pela matriz extracelular, diferenciação de uma subpopulação bacteriana em um estado fenotipicamente resistente, expressão de genes específicos de resistência a antimicrobianos, entre outros (Pereira, 1999; Patel, 2005; Ten Cate et al., 2009; Otto, 2013; Lobo et al., 2014).

A principal ação para a remoção do biofilme dental é a ação mecânica e o uso rotineiro de dentifrícios e enxaguatórios bucais contendo agentes antimicrobianos (Santos, 2003; Davies, 2008). A busca de produtos com propriedades antimicrobianas em materiais dentários, com primeiros registros em 1987, possui mais de 170 publicações sobre o assunto (Wang et al., 2014).

O biofilme dental tem sido considerado o principal fator etiológico da doença periodontal, que é caracterizada por uma resposta inflamatória e imunológica da gengiva e estruturas subjacentes como o osso alveolar, ligamento periodontal e cimento, podendo ser classificada como gengivite, quando acomete os tecidos de proteção e como periodontite, quando afeta os tecidos de suporte do elemento dentário (Gebran & Gebert, 2002; Pion et al., 2006).

Os óleos essenciais têm se destacado como promissora fonte de compostos bioativos com potencial aplicação na prevenção e tratamento de afecções da cavidade oral, entre elas a formação do biofilme dental (Lynch & Robertson, 2008). Possivelmente, os óleos essenciais exercem influência na formação de biofilme pela interferência nas comunicações intercelulares no sensor quorum sensing bacteriano, inibição da aderência bacteriana às superfícies, inativação das células do biofilme e indução da dispersão precoce do biofilme (Gao et al., 2003; Yang et al., 2012; Schillaci et al., 2013).

A maior parte do conhecimento sobre o metabolismo bacteriano foi obtido em estudos de bactérias em estado planctônico (de vida livre), porém estima-se que 80% da biomassa bacteriana mundial existam na forma de biofilme (Davies, 2003), o que justifica o interesse na descoberta compostos com atividade antibiofilme.

### 2.2.3. Cárie dentária

A cárie dentária é conhecida por ser uma das doenças infecciosas orais mais prevalentes do mundo e tem o biofilme dental como sua principal causa (Bowenand & Koo 2011). Essa doença afeta 60 a 90% das crianças em idade escolar e a grande maioria dos adultos, sendo observado um aumento acentuado na prevalência a nível global (Petersen, 2005; Bagramian et al., 2009; Menezes et al., 2010).

A cárie é uma doença causada pela ação de ácidos produzidos por bactérias cariogênicas que promovem um processo de descalcificação do esmalte dentário e da dentina e bactérias como *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* são particularmente eficazes no processo de transformação de açúcar em ácido graças à sua capacidade de viverem e de se multiplicarem no meio ácido que originam. Acredita-se que *S. mutans* esteja envolvido com o desenvolvimento inicial da cárie, enquanto espécies de *Lactobacillus* sejam os responsáveis pelo comprometimento da lesão (Van Houte, 1993; Reis & Melo, 2003). Essa doença tem sido associada com um impacto negativo sobre a qualidade de vida relacionada à saúde bucal sendo considerada uma doença infecciosa multifatorial onde a dieta, infecção microbiana, resposta do hospedeiro entre outros fatores desempenham papéis importantes (Smith, 2002; Abanto et al., 2011). Algumas medidas como uma higiene oral adequada e dieta com menor concentração de carboidratos contribuem para a prevenção da cárie dental (Andreolli & Lara, 2004).

Abaixo, (Figura 2) podemos observar lesões cariosas precoces da infância.



**Figura 2** Cárie precoce da infância (Areias et al., 2010).

### 2.3. Dentifrícios e agentes antimicrobianos

A palavra dentifrício, que corresponde a um composto farmacêutico usado em conjunto com uma escova de dente para limpar e polir os dentes, começou a ser usada na Inglaterra, por volta de 1558 (Fischman, 1992). Ao longo da história os dentifrícios tem sido utilizados por diferentes povos e sua composição evoluiu desde os pós constituídos por ervas, minerais, cinzas e ossos de animais até aos cremes e géis dentais disponíveis no mercado (Wohleber, 2002).

Dentifrícios são produtos semi-sólidos de viscosidade variada, que permitem a remoção da placa bacteriana. Os dentifrícios são considerados o veículo mais adequado e eficiente para a liberação dos agentes terapêuticos na cavidade oral, o que auxilia a remoção mecânica, prevenindo a instalação da cárie e demais afecções bucais (Meyer et al., 2007; Irie et al., 2014).

O controle da placa dentária é a chave para a prevenção de doenças da cavidade oral, que envolve a inibição do crescimento ou a morte das bactérias alvo (Biesbrock et al., 2002; Marsh, 2005). Mesmo com a educação continuada da população, a maioria dos indivíduos remove apenas 60% da placa dental após a escovação e essa incapacidade de manter uma boa higiene é refletida na prevalência generalizada de cárie e outras afecções orais (Claydon, 2008).

Dentre os agentes antimicrobianos utilizados para a prevenção e tratamento de doenças na cavidade oral como clorexidina, triclosam, cloreto de cetilpiridínio e flúor a clorexidina é a mais eficaz atuando com eficiência na redução da placa bacteriana. Em altas concentrações, a clorexidina é bactericida e causa dano letal a parede bacteriana, já em doses subletais, inibe o transporte de açúcar, a produção de ácido pelas bactérias cariogênicos e inibe a ação das enzimas responsáveis pela manutenção de um pH intracelular apropriado (Paraskevas, 2005; Fine et., al 2007; Scheie & Petersen, 2008; Passariello et al., 2014), sendo utilizada pelos profissionais tanto na odontologia veterinária quanto na humana (Ribeiro et al., 2007). Porém, seu uso tem sido restrito a poucos dias, devido a efeitos indesejáveis, como perda de paladar, escurecimento do esmalte dos dentes entre outros (Passariello et al., 2014).

Devido aos problemas causados pelo uso de compostos sintéticos associados a produtos de higiene oral, produtos naturais com atividade antibacteriana e antibiofilme estão sendo investigados para melhorar a saúde e

prevenir a ocorrência de doenças como a cárie e periodontite, que são causadas por formações de biofilme. Desta forma, extratos e óleos essenciais de plantas estão sendo investigados como potenciais fontes de novos compostos com atividade biológica (Allaker & Douglas 2009; Farrugia et al., 2015).

### **2.3.1. Fluorose dental**

A diminuição da prevalência de cárie dentária tem sido atribuída em grande parte ao uso de dentifrício fluoretado (Cury et al., 2004), sendo a escovação com esses dentifrícios uma das medidas mais aceitas para o controle da cárie dentária (Ricomini et al., 2012). Por outro lado, se o flúor é ingerido em doses excessivas pode desencadear o surgimento de alterações estruturais conhecidas como fluorose dental, que se caracteriza por manchas no esmalte do dente (Fejerskov et al., 1990).

A associação entre o uso precoce de dentifrício fluoretado e a prevalência de fluorose dental é amplamente relatado na literatura (Jiménez-Farfán et al., 2011). O predomínio e gravidade da fluorose dental estão relacionados com a quantidade de flúor ingerida, tempo de exposição e da duração da exposição (Ferreira et al., 2010). A maioria das marcas comerciais de dentifrícios no mercado brasileiro são fluoretadas e servem como fontes importantes de flúor, apresentando risco substancial associada à ingestão por crianças até seis anos de idade (Mascarenhas, 2000; Falcão et al., 2013). Além disso, os dentifrícios para crianças são mais atraentes quando comparados com as pastas direcionadas para os adultos, levando, desta forma, a uma utilização mais frequente pelas crianças (Nascimento et al., 2013). Dependendo da sua gravidade a fluorose dental pode não apenas ter consequências estéticas, mas também pode causar dor e afetar negativamente a eficiência mastigatória (Washington, 2006).

Na Figura abaixo (Figura 3), podemos observar diferentes graus de fluorose dentária.



**Figura 3** Graus leve, moderado e severo da fluorose dentária – Fonte Fluoridatron Forum Report, 2002, p. 126.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

- Avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme de óleos essenciais puros e associados a cremes dentais sobre bactérias cariogênicas.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar a atividade antibacteriana in vitro dos óleos essenciais;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos OEs ativos;
- Avaliar o efeito dos óleos essenciais ativos sobre o biofilme bacteriano pré-formado;
- Avaliar a interação entre os óleos essenciais ativos e a clorexidina;
- Manipular os cremes dentais;
- Avaliar a atividade antimicrobiana in vitro dos cremes dentais;
- Avaliar o efeito dos cremes dentais sobre o biofilme bacteriano pré-formado;
- Análise cromatográfica dos óleos essenciais;
- Análise estatística.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais utilizados no presente estudo (Tabela 2) foram extraídos em escala industrial por hidrodestilação a arraste de vapor pelas empresas Empório Laszlo: canela, alecrim, noz moscada e laranja. Empresa Ferquima Ind. e Com. de Óleos Essenciais: hortelã, gengibre, orégano, tomilho branco, cravo e pelo Laboratório de Síntese de Agroquímicos – UFV (LASA): melaleuca, tangerina, lima e eucalipto.

**Tabela 2** Identificação dos óleos essenciais utilizados.

<b>Nome Científico</b>	<b>Nome popular</b>	<b>Partes utilizadas</b>	<b>Identificação usada</b>
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Alecrim	ramos	1
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Canela do ceilão	casca	2
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Melaleuca	folhas	3
<i>Myristica fragrans</i>	Noz moscada	sementes	4
<i>Eugenia caryophyllata</i>	Cravo	talo	5
<i>Zingiber officinale</i>	Gengibre	raiz	6
<i>Citrus sinensis</i>	Laranja	casca dos frutos	7
<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	folhas	8
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomilho branco	folhas	9
<i>Citrus reticulata</i>	Tangerina	casca dos frutos	10
<i>Citrus aurantifolia</i>	Lima comum	casca dos frutos	11
<i>Eucalyptus citriodora</i>	Eucalipto	folhas	12
<i>Mentha Piperita</i>	Hortelã-pimenta	folhas	13

## **4.2. Microrganismos utilizados**

Foram utilizadas cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Enterococcus* sp. e *Lactobacillus* sp. pertencentes a bacterioteca do Laboratório de Doenças bacterianas do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa e cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pertencentes ao Laboratório BioNat do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular-UFV.

As bactérias foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo BHI líquido e cresceram em estufa overnight a 37 °C. Foram transferidos 1 mL do inóculo de cada bactéria e 1 mL do branco (meio estéril) para microtubos distintos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. O branco foi utilizado para calibrar o aparelho. As amostras que não apresentaram absorção entre 0.100 a 0.190 foram diluídas em série, até obter a leitura mencionada. Obtido a absorção desejada, realizou-se duas diluições seriadas 1:10, afim de se obter a concentração de 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> para o plaqueamento das bactérias.

### **4.2.1. Armazenamento dos microrganismos utilizados**

Culturas bacterianas foram estriadas em placas contendo ágar BHI e mantidas por 16 horas a 37 °C. Para preparo dos estoques as colônias foram inoculadas em 5 mL de caldo BHI e mantidas em estufa a 37 °C por 16-18 horas. Esse volume foi transferido para microtubos de 1,5 mL e centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 850 µL de BHI com adição posterior de 150 µL de glicerol estéril. Os microtubos foram mantidos a -80 °C.

## **4.3. Avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais**

A atividade antibacteriana dos 13 óleos essenciais foi avaliada segundo a técnica de difusão em ágar pelo método hole plate em meio BHI segundo a metodologia descrita por Bauer e colaboradores (1966), com modificações. Após multiplicação por 24 h a 37 °C, os isolados bacterianos (*S. mutans* ATCC

25175, *S. aureus* ATCC 25923, *Lactobacillus* sp. e *Enterococcus* sp.) foram diluídos para a concentração final de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> e 134 µL das bactérias foram acrescidas a 20 mL de meio ágar BHI. Após solidificação, furos de aproximadamente 5 mm de diâmetro e 3 mm de altura foram feitos no ágar. Foram inoculados em cada poço 10 µL do óleo essencial na concentração de 100 mg/mL<sup>-1</sup>, DMSO como controle negativo e gluconato de clorexidina a 0,12% (PerioGard®) como controle positivo. As placas foram colocadas em estufa de crescimento a 37 °C, overnight. Para testes com *S. mutans* foi utilizada jarra de anaerobiose. Após esse período, os halos de inibição foram medidos em milímetros. O teste foi realizado em triplicata e as médias dos halos de inibição advindas dos tratamentos foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% de significância.

Segundo Inoue (2014) zonas de inibição menores que 1 mm não apresentam atividade antibacteriana, zonas de inibição entre 2-3mm apresentam atividade antibacteriana pequena, zona de inibição entre 4-5mm apresentam atividade antibacteriana moderada, zona de inibição entre 6-9mm apresentam atividade antimicrobiana alta e zonas de inibição maiores a 9mm apresentam forte inibição antibacteriana.

No presente estudo, os óleos que apresentaram halo de inibição acima de 6mm foram considerados com potencial ação antibacteriana.

#### **4.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos OEs ativos**

Os testes de concentração inibitória mínima foram realizados com os óleos que apresentaram atividade antibacteriana no teste de difusão em ágar pela metodologia padronizada de microdiluição em caldo em microplacas de 96 poços, segundo a metodologia descrita por Benfatti e colaboradores (2010), com modificações. Primeiramente, foi realizada uma diluição seriada dos óleos essenciais de canela, cravo, orégano e tomilho, onde a 100 µL de BHI foram adicionados 100 µL de OE; desta solução, 100 µL foram retirados e homogeneizados com 100 µL de meio de cultura no poço seguinte, e assim sucessivamente, obtendo-se assim concentrações de OE de 10,0 mg/mL, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,625 mg/mL, 0,312 mg/mL, 0,156 mg/mL e 0,078 mg/mL. Para a determinação da CIM do controle positivo, a

concentração inicial foi de 0,6 mg/mL. A estas concentrações de OEs foram adicionados 100 µL de suspensão bacteriana ajustada para concentração final de  $10^6$  UFC/mL. Como controle negativo, foi utilizado o solvente dimetilsulfóxido (DMSO), sem o óleo essencial e como controle positivo foram adicionados 10 µL de gluconato de clorexidina a 0,12% (PerioGard®). Os testes foram realizados em duplicata.

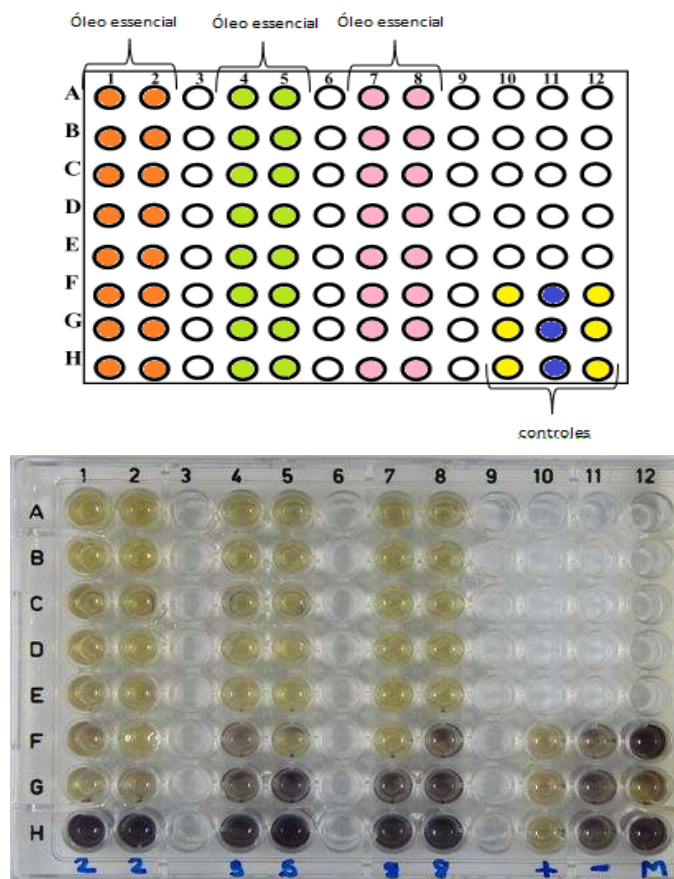
A microplaca foi mantida em estufa a 37 °C por 24 h. Após incubação, foram adicionados 20µL do sal MTT (3-{4,5-dimetiltiazol-2-il}-2,5-difeniltetrazolium bromide) (2,0 mg/mL) e a microplaca foi incubada por mais 30 minutos.

A CIM baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias viáveis, de converter o sal de tetrazolium (MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarela, em cristais de formazan, que são insolúveis em água e de cor azul-escura. Essa conversão indica a atividade mitocondrial que somente as células viáveis possuem.

A determinação da CIM foi qualitativa e visual, uma vez que os poços com bactérias viáveis são de coloração azul e os poços com bactérias mortas permanecem com a coloração do meio de cultura. Considera-se o valor da concentração inibitória mínima a concentração do poço sem coloração seguido por um poço com crescimento bacteriano.

Para a classificação dos valores de CIM, foram considerados valores de CIM abaixo de 0,5 mg/mL como forte inibição, valores de 0,5 mg/mL a 1,5 mg/mL relacionados com inibição moderada e valores acima de 1,5 mg mL inibição fraca (Aligiannis et al., 2001).

Na figura abaixo (Figura 4), podemos observar um exemplo do esquema da CIM.



**Figura 4** Esquema da placa de ELISA para determinação da CIM. Poços com coloração amarela possuem bactérias mortas e poços com coloração azul bacteriais metabolicamente ativos.

#### 4.5. Avaliação dos óleos essenciais ativos sobre os biofilmes bacterianos pré-formados

A avaliação dos óleos essenciais ativos sobre os biofilmes bacterianos pré-formados foi determinada segundo a metodologia descrita por Klein e colaboradores (2015), com modificações. Foram utilizadas as cepas *S. aureus* ATCC 25923, *S. mutans* ATCC 25175 e *Enterococcus* sp. Em microplacas de 96 poços, foram adicionados 100 µL de meio de cultura BHI suplementado com 0,25% de glicose (BHIg) e 100 µL de uma suspensão bacteriana correspondente a  $10^6$  UFC/ mL. A microplaca foi incubada a 37°C por 24 horas e logo após foi feita a leitura de absorvância a 600 nm em leitor de ELISA para confirmar a presença de crescimento bacteriano no meio de cultura. O sobrenadante foi retirado dos poços cuidadosamente e foram adicionados 200

$\mu\text{L}$  de BHIg juntamente com os OEs nas seguintes concentrações: 4XCIM, 2XCIM, CIM, 1/2CIM e 1/4CIM. A microplaca foi incubada por 6 horas, o sobrenadante foi novamente retirado e os poços foram lavados 3 vezes com 200  $\mu\text{L}$  de tampão PBS 1X em pH 7,4. Logo após, todos os poços foram corados com 200  $\mu\text{L}$  de cristal violeta (CV) 0,1% por 30 minutos. O excesso de CV foi removido lavando-se os poços por três vezes com 200  $\mu\text{L}$  de água destilada. Finalmente, 150  $\mu\text{L}$  de etanol 95% foram adicionados nos poços e após 45 minutos, foram feitas as leituras de absorvância no comprimento de onda de 560 nm com agitação por 10 segundos. O controle negativo consistiu de BHI. Os testes foram realizados em triplicata.

#### **4.6. Avaliação da interação entre os óleos essenciais ativos e a clorexidina**

O método de checkerboard, que é comumente utilizado para medida de inibição interativa, foi utilizado para determinação de sinergismo entre o antisséptico bucal (clorexidina) e os óleos essenciais que apresentaram halos de inibição com diâmetro superior a 6mm.

Em microplaca de 96 poços, um volume de 100  $\mu\text{L}$  de caldo BHI foi distribuído em cada poço. O antisséptico bucal comercial Periogard® foi adicionado (100  $\mu\text{L}$ ) ao longo dos poços da primeira coluna em uma concentração correspondente a 8XCIM, e diluído serialmente no eixo das abscessas. Terminada a distribuição do antisséptico, o óleo essencial (somente os óleos ativos) foi adicionado (100  $\mu\text{L}$ ) na primeira linha da placa em uma concentração de 4XCIM, e diluído serialmente no eixo das ordenadas. Realizadas as diluições, o controle e o OE estarão distribuídos nos poços em concentrações variando de 2X até 1/8X CIM. Uma suspensão bacteriana de *S. mutans* ATCC 25175 correspondente a  $10^6$  UFC/ mL foi preparada. e desta suspensão foram pipetadas 100 $\mu\text{L}$  em cada poço. As placas foram incubadas por 24h a 37°C. A avaliação da multiplicação bacteriana foi feita utilizando a adição de 20  $\mu\text{L}$  de MTT (2 mg/mL) nos poços, e incubando a placa a 37°C por 30 minutos.

Na figura abaixo (Figura 5) estão descritos os esquemas de diluições das amostras nos poços após as diluições da clorexidina e dos óleos essenciais.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	2X 2X	2X 1X	2X 1/2X	2X 1/4X	2X 1/8X	2X		
B	1X 2X	1X 1X	1X 1/2X	1X 1/4X	1X 1/8X	1X		
C	1/2X 2X	1/2X 1X	1/2X 1/2X	1/2X 1/4X	1/2X 1/8X	1/2X		
D	1/4X 2X	1/4X 1X	1/4X 1/2X	1/4X 1/4X	1/4X 1/8X	1/4X		
E	1/8X 2X	1/8X 1X	1/8X 1/2X	1/8X 1/4X	1/8X 1/8X	1/8X		
F	2X	1X	1/2X	1/4X	1/8X	0 e 0		

**Figura 5.** Esquema de diluições das amostras nos poços após as diluições seriadas de clorexidina e óleos essenciais para o método de checkerboard. Concentrações de clorexidina em azul e do óleo em laranja.

A CIM da interação entre o antisséptico e o óleo essencial provém da combinação de ambos na menor concentração que inibiu o crescimento bacteriano. Os efeitos das combinações foram avaliados pelo cálculo do índice CIF (concentração inibitória fracionária) para cada combinação usando as fórmulas abaixo. Para o método utilizado, as interações são interpretadas com base no  $\Sigma$ CIF, quando este valor é  $\leq 0,5$ , considera-se a interação como sinergismo; para  $0,5 < \Sigma$ CIF  $\leq 1$  a interação é aditiva; para  $1 < \Sigma$ CIF  $\leq 4$  a interação indiferente; e valores maiores que 4 são antagonismo (Palaniappan & Holey, 2010).

$$\text{CIF (antisséptico)} = \frac{\text{CIM (antisséptico) em combinação}}{\text{CIM (antisséptico) sozinho}}$$

$$\text{CIF (óleo essencial)} = \frac{\text{CIM (óleo essencial) em combinação}}{\text{CIM (óleo essencial) sozinho}}$$

$$\text{Índice de CIF} = \Sigma = \text{CIF (antisséptico)} + \text{CIF (óleo essencial)}$$

#### 4.7. Seleção e manipulação dos cremes dentais

Os cremes dentais foram manipulados utilizando os óleos essenciais ativos sendo eles os óleos de *C. zeylanicum* (2), *E. caryophyllata* (5), *O.*

vulgare (8) e *T. vulgaris* (9). A composição e quantidade dos componentes utilizados se encontram descritos na Tabela 3.

**Tabela 3** Composição e quantidade dos componentes usados na formulação dos cremes dentais à base dos óleos essenciais ativos.

Composição	Cremes Dentais										
	Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Carbonato de cálcio 19%	190	190	190	190	190	190	190	190	190	190	190
sorbitol 20%	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
lauril sulfato de sódio pó 1,2%	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Carboximetil celulose 2%	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
goma xantana 1%	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
sacarina 0,1%	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Metilparabeno 0,15%	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Glicerina 3%	30	30	30	30	30	30	30	30	30	0	30
água purificada qsp	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Concentração 3 e 5%	2*	5*	8*	9*	2+5 <sup>#</sup>	8+9 <sup>#</sup>	2+9 <sup>#</sup>	5+8 <sup>#</sup>	2+5+8	+9	BR

\* Óleos essenciais ativos; <sup>#</sup> mistura dos óleos; BR pasta pura sem os óleos essenciais

Pesaram-se os componentes da formulação. Aqueceu-se 70% da água purificada da fórmula a 90<sup>o</sup>C, após, incorporou-se a carboximetilcelulose, goma xantana, sacarina, carbonato de cálcio e metilparabeno. Com agitação contante incorporou-se o sorbitol a mistura anteriormente formada, ate completa homogeneização. Após a homogeneização acrescentou-se o agente tensoativo no umectante (glicerina) e homogeneizeinou-se novamente lentamente até a formação da pasta. Deixou-se a pasta formada em repouso por no minimo 24 horas, sendo em seguida envazada para evitar ressecamento.

#### **4.8. Avaliação da atividade antibacteriana dos cremes dentais**

Amostras de 1 g de creme dental formuladas com os óleos essenciais a 3% e 5% foram diluídos em 2 mL de solução salina 0,85% estéril, sendo em seguida homogeneizadas em vórtex e centrifugadas a 400 xg por 15 minutos com o objetivo de precipitar partículas sólidas do dentifrício. O sobrenadante foi retirado e armazenado para posterior análise.

A atividade antibacteriana dos 18 cremes dentais foi avaliada segundo a técnica de difusão em ágar pelo método hole plate em meio BHI segundo a metodologia descrita por Bauer e colaboradores (1966), com modificações. Após multiplicação por 24 h a 37 °C, os isolados bacterianos (*S. mutans* ATCC 25175, *S. aureus* ATCC 25923, *Lactobacillus* sp. e *Enterococcus* sp.) foram diluídos para a concentração final de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> e 134 µL das bactérias foram acrescidas a 20 mL de meio ágar BHI. Após solidificação, furos de aproximadamente 5 mm de diâmetro e 3 mm de altura foram feitos no ágar. Foram inoculados em cada poço 10 µL do óleo essencial na concentração de 100 mg/mL<sup>-1</sup>, creme dental sem óleo essencial como controle negativo e gluconato de clorexidina a 0,12% (PerioGard®) como controle positivo. As placas foram colocadas em estufa de crescimento a 37 °C, overnight. Para testes com *S. mutans* foi utilizada jarra de anaerobiose. Após esse período, os halos de inibição foram medidos em milímetros. O teste foi realizado em triplicata. Foram considerados como potencial atividade antibacteriana halos de inibição acima de 6 mm.

As médias dos halos de inibição advindas dos tratamentos foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% de significância.

#### **4.9. Avaliação dos cremes dentais sobre o biofilme bacteriano pré-formado**

A avaliação dos cremes dentais sobre os biofilmes bacterianos pré-formados foi determinada segundo a metodologia descrita por Klein e colaboradores (2015), com modificações. Foram utilizadas as cepas *S. aureus* ATCC 25923, *S. mutans* ATCC 25175 e *Enterococcus* sp. Em microplacas de 96 poços, foram adicionados 100 µL de meio de cultura BHI suplementado com 0,25% de glicose (BHIg) juntamente com 100 µL de uma suspensão bacteriana correspondente a  $10^6$  UFC/mL. A microplaca foi incubada a 37°C

por 24 horas e logo após foi feita a leitura de absorvância a 600 nm em leitor de ELISA para confirmar a presença de crescimento bacteriano no meio de cultura. O sobrenadante foi retirado dos poços cuidadosamente e foram adicionados 200 µL de BHIg juntamente com o sobrenadante dos cremes dentais centrifugados nas concentrações de 3% e 5%. A microplaca foi incubada por 6 horas, o sobrenadante foi novamente retirado e os poços foram lavados 3 vezes com 200 µL de tampão PBS 1X em pH 7,4. Logo após, todos os poços foram corados com 200 µL de cristal violeta (CV) 0,1% por 30 minutos. O excesso de CV foi removido lavando-se os poços por três vezes com 200 µL de água destilada. Finalmente, 150 µL de etanol 95% foram adicionados nos poços e após 45 minutos, foram feitas as leituras de absorvância no comprimento de onda de 560 nm com agitação por 10 segundos. O controle negativo consistiu de BHI. Os testes foram realizados em triplicata.

#### **4.10. Análises cromatográficas dos óleos essenciais**

Os cromatogramas dos óleos essenciais adquiridos pelas empresas Laszlo e Ferquima foram emitidos pelas próprias empresas. As análises cromatográficas dos demais óleos, incluindo os que apresentaram atividade, foram realizadas em equipamento CG-EM SHIMADZU GCMS-QP5050A do Departamento de Química da UFV, coluna cromatográfica DB-5 de 30 m de comprimento e 0,25mm de diâmetro interno e 0,5 micrometros de espessura do filme. As condições usadas foram temperaturas de 220 °C no injetor, modo split (razão: 15), com 40 °C iniciais por 2 minutos acrescidos de 3 °C por minuto até 240 °C, durante 10 minutos. O fluxo do gás foi de 1,8 mL.min<sup>-1</sup>.

#### **4.11. Análises Estatísticas**

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) com o software estatístico SAS (SAS Institute, 1997). Neste teste, as amostras com o mesmo índice **abcd** não diferem estatisticamente entre si e as amostras com índices diferentes **abcd** diferem estatisticamente.

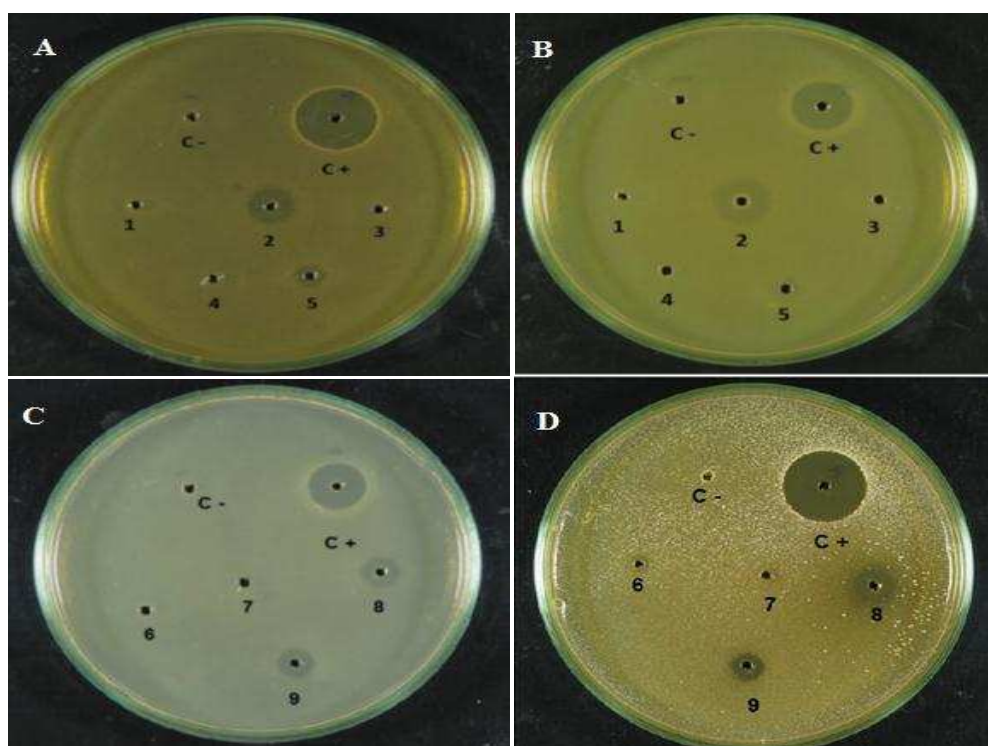
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais

Os treze óleos essenciais foram avaliados em relação à atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar e os óleos que apresentaram atividade antibacteriana foram submetidos ao teste de concentração inibitória mínima (CIM) e avaliação da atividade antibiofilme.

Apenas os óleos de canela (2), cravo (5), orégano (8) e tomilho (9) apresentaram atividade antibacteriana frente às bactérias *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus* sp. e *Lactobacillus* sp.

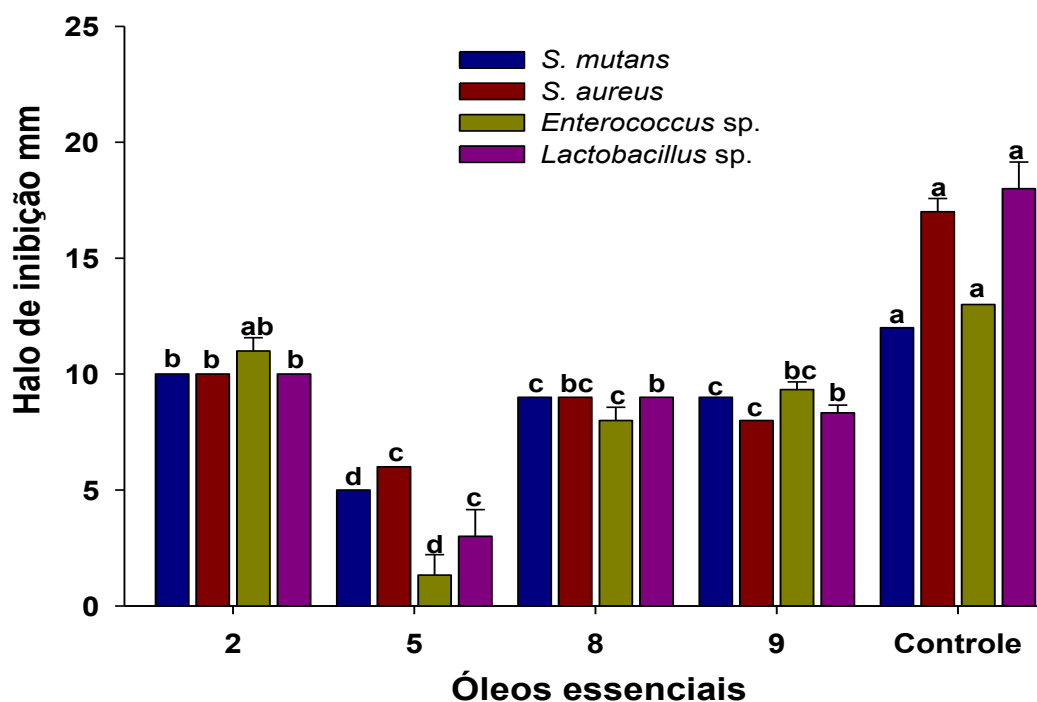
A Figura abaixo (Figura 6) mostra os resultados dos testes de difusão em ágar para os óleos essenciais, controle positivo (digluconato de clorexidina a 0,12%) e controle negativo (DMSO).



**Figura 6.** Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de alecrim (1), canela (2), melaleuca (3), noz moscada (4), cravo (5) gengibre (6), laranja (7), orégano (8), tomilho (9) frente as bactérias *Lactobacillus* sp. (A) *Enterococcus* sp. (B) *Streptococcus mutans* (C) *Staphylococcus aureus* (D).

Na Figura 7 estão apresentadas as médias dos halos de inibição dos óleos essenciais ativos, do controle positivo (digluconato de clorexidina a 0,12%) e a comparação entre as médias obtidas pelo teste de Tukey a 5% de

probabilidade.



**Figura 7** Halos de inibição em milímetros dos óleos essenciais de *C. zeylanicum* (2), *E. caryophyllata* (5), *O. vulgare* (8), *T. vulgaris* (9) e controle positivo (clorexidina) para as bactérias *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus sp.* e *Lactobacillus sp.*

No presente estudo, os óleos essenciais que apresentaram halo de inibição acima de 6mm foram considerados com potencial ação antibacteriana, assim sendo, os óleos de *C. zeylanicum* (2), *O. vulgare* (8) e *T. vulgaris* (9) apresentam forte atividade antibacteriana para todas as bactérias testadas com halos de inibição entre 8 e 11 mm.

Os resultados referentes a atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar mostraram que os óleos essenciais considerados estatisticamente mais eficazes contra *S. aureus* foram de *C. zeylanicum* (2) e *O. vulgare* (8), seguidos pelos óleos de *E. caryophyllata* (5) e *T. vulgaris* (9), para *S. mutans* o óleo de *C. zeylanicum* (2) e para *Lactobacillus sp.* os óleos essenciais de *C. zeylanicum* (2), *O. vulgare* (8) e *T. vulgaris* (9) foram os mais eficientes. Para testes com a bactéria *Enterococcus sp.* o óleo essencial *C. zeylanicum* (2) não diferiu estatisticamente do controle positivo (clorexidina), sendo considerado o tratamento mais eficaz.

Os óleos essenciais que apresentaram atividade antibacteriana no presente estudo são utilizados como condimentos na dieta humana e, por isso,

considerados menos nocivos para humanos que a maioria dos produtos sintéticos (Tunc et al., 2000). A comprovação através de estudos científicos das atividades biológicas de óleos essenciais são interessantes pois representam uma alternativa segura e econômica para a substituição de produtos sintéticos.

Diaz e colaboradores (2007) em estudo utilizando o método de difusão em ágar demonstraram atividade significativa dos óleos essenciais de *C. zeylanicum* e *E. caryophyllata* sobre a bactéria *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Greatt e colaboradores (2014) avaliaram a atividade antibacteriana do óleo de *C. zeylanicum* pelo método de difusão em ágar e verificaram que o mesmo apresentou atividade antibacteriana contra a bactéria *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, com halos de inibição de 13mm, semelhante ao encontrado no presente estudo.

Ghabraie e colaboradores (2016) em estudo utilizando três métodos, incluindo ensaio de difusão em agar, avaliou as atividades antimicrobianas de 32 OEs contra 5 agentes patogênicos alimentares, entre eles *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e concluíram que os óleos de *C. zeylanicum*, *O. vulgare* e *T. vulgaris* apresentaram atividade contra a bactéria *S. aureus*. A inibição de *S. aureus* ATCC 25923 também foi descrita por Pereira e colaboradores (2008) em estudo que avaliou o efeito inibitório dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Origanum vulgare* (orégano) e *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia).

## **5.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos OEs ativos**

A concentração inibitória mínima é definida como a menor concentração em que um composto apresenta inibição da atividade bacteriana. Assim, quanto menor for a concentração de um composto necessária para a inibição, melhor será a sua atividade antibacteriana. No presente estudo, o teste de concentração inibitória mínima foi realizado somente com os óleos que apresentaram ação antibacteriana no teste de difusão em ágar e os resultados estão expostos na tabela abaixo (Tabela 4).

**Tabela 4** Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais ativos frente as bactérias *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus* sp. e *Enterococcus* sp.

Óleos essenciais	Bactérias			
	<i>S. mutans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Lactobacillus</i> sp	<i>Enterococcus</i> sp
	CIM (mg/mL)			
<i>C. zeylanicum</i> (2)	0,156	0,625	1,250	0,625
<i>E. caryophyllata</i> (5)	0,625	1,250	2,500	2,500
<i>O. vulgare</i> (8)	0,625	0,625	1,250	0,625
<i>T. vulgaris</i> (9)	1,250	1,250	0,625	1,250
Clorexidina	0,005	0,005	0,005	0,005

De acordo com o critério estabelecido para a avaliação da CIM podemos observar que o óleo essencial de *C. zeylanicum* (2) apresentou inibição forte com valor de CIM de 0,156 mg/mL para a bactéria *Streptococcus mutans*, os óleos de *O. vulgare* (8) e *T. vulgaris* (9) apresentaram inibição moderada para todas as bactérias, com valores variando de 0,625 a 1,25 mg/mL e o óleo essencial de *E. caryophyllata* (5) apresentou inibição moderada para as bactérias *S. mutans* (0,625 mg/mL) e *Staphylococcus aureus* (1,25 mg/mL) e inibição fraca para *Lactobacillus* sp. (2,50 mg/mL) e *Enterococcus* sp. (2,50 mg/mL).

A forte inibição do óleo essencial de canela para a bactéria *S. mutans* e um dado interessante frente a importância dessa bactéria na formação do biofilme dental e lesões cáries (Bueno-Silva et al., 2013).

O interesse por agentes antibacterianos naturais tem aumentado e estudos das atividades antibacterianas desses produtos vêm demonstrando que os mesmos apresentam eficácia frente a diferentes microrganismos. A utilização de plantas medicinais no tratamento e prevenção de patologias da cavidade bucal apresenta várias vantagens em relação ao tratamento alopático, entre elas o menor custo e a menor toxicidade (França et al., 2007).

Fani e colaboradores (2011) em estudo utilizando o método de CIM descreveu a atividade antibacteriana do óleo de *C. zeylanicum* contra a bactéria *S. mutans* isolada de dentes cariados. Já o óleo essencial de *E. caryophyllata*

foi ativo contra *S. mutans* apresentado MIC de 0,6 mg/ml (Silvestri et al., 2010), valor semelhante ao encontrado em nosso estudo.

Da mesma forma, o óleo essencial de *T. vulgaris* apresentou atividade inibitória contra as bactérias *S. mutans* ATCC 25175 e *S. aureus* ATCC 25923 através das técnicas de CIM e CBM (Freire et al., 2014) e Santos e colaboradores (2010) reportaram que o óleo de *T. vulgaris* puro e incorporado a enxaguatório bucal inibiu a bactéria *S. mutans* ATCC 25175 pelo método de CIM.

Unlu e colaboradores (2010), em estudo utilizando o óleo essencial das cascas de *C. zeylanicum* identificaram atividade antibacteriana contra a bactéria *S. aureus* ATCC 29213 e encontraram um valor de CIM de 0,56 mg/mL, o que se assemelha ao encontrado no presente estudo. Jovanka e colaboradores (2011) concordam que o óleo essencial de *O. vulgare* foi eficaz contra a bactéria *S. aureus* com valor de CIM de 0,78 mg/mL, valor similar ao encontrado no presente estudo.

Diversos estudos na literatura utilizando CIM descrevem a efetiva inibição de *S. aureus* pelos óleos essenciais de *C. zeylanicum* (Lopez et al., 2007; Probst et al., 2011; Barbosa et al., 2015) *O. vulgare* (Lopez et al., 2007; Oliveira et al., 2009; Costa et al., 2009; Höferl et al., 2009; Soković et al., 2010; Silveira et al., 2012; Pesavento et al., 2015; Miller et al., 2015), *T. vulgaris* (Höferl et al., 2009; Soković et al., 2010; Sienkiewicz et al., 2011; Pesavento et al., 2015) e *E. caryophyllata* (Hernández-Ochoa et al., 2014).

Como em nosso estudo, *Enterococcus* sp. foi inibida pelos óleos essenciais de *T. vulgaris* (Sienkiewicz et al., 2011) e *C. zeylanicum* (Urbaniak et al., 2014) pelo método de CIM.

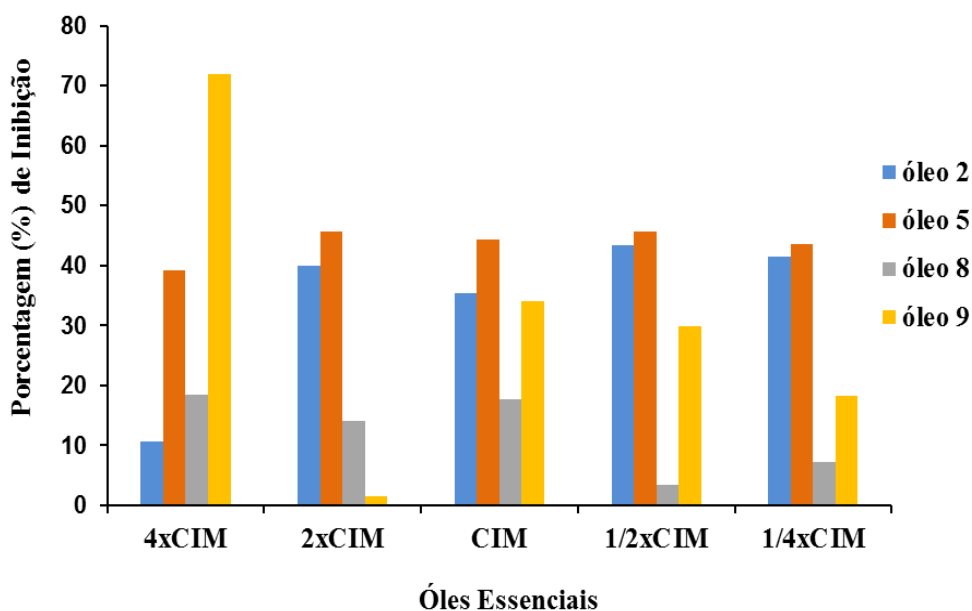
O óleo essencial de *O. vulgare* inibiu *Lactobacillus acidophilus* (Miller et al., 2015) e *Lactobacillus plantarum* (Silveira et al., 2012), e o óleo de *C. zeylanicum* e *T. vulgaris* apresentaram atividade antibacteriana contra diferentes espécies de *Lactobacillus* (Dunn et al., 2016).

Os resultados demonstrando a eficácia antibacteriana dos óleos essenciais de canela (2), cravo (5), orégano (8) e tomilho (9) utilizados no presente estudo corroboram com resultados descritos na literatura tornando-os uma possível alternativa para aplicação nas indústrias farmacêuticas, de alimentos e cosméticas, devido aos seus efeitos biológicos comprovados.

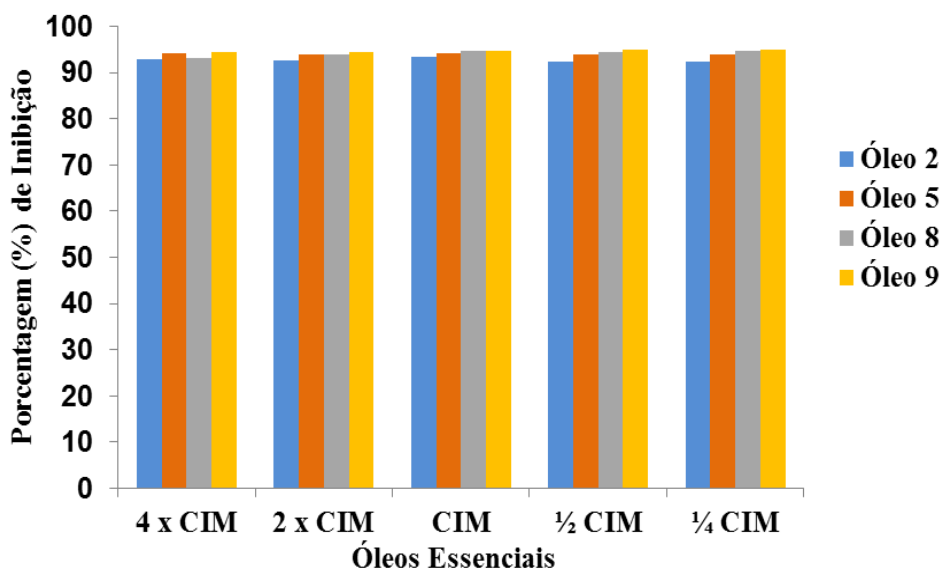
### 5.3. Avaliação dos óleos essenciais ativos sobre o biofilme bacteriano pré-formado

A avaliação dos óleos essenciais ativos sobre os biofilmes foi realizada utilizando as bactérias *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus* sp. Não foi utilizada a bactéria *Lactobacillus* sp. pois a mesma não forma biofilme.

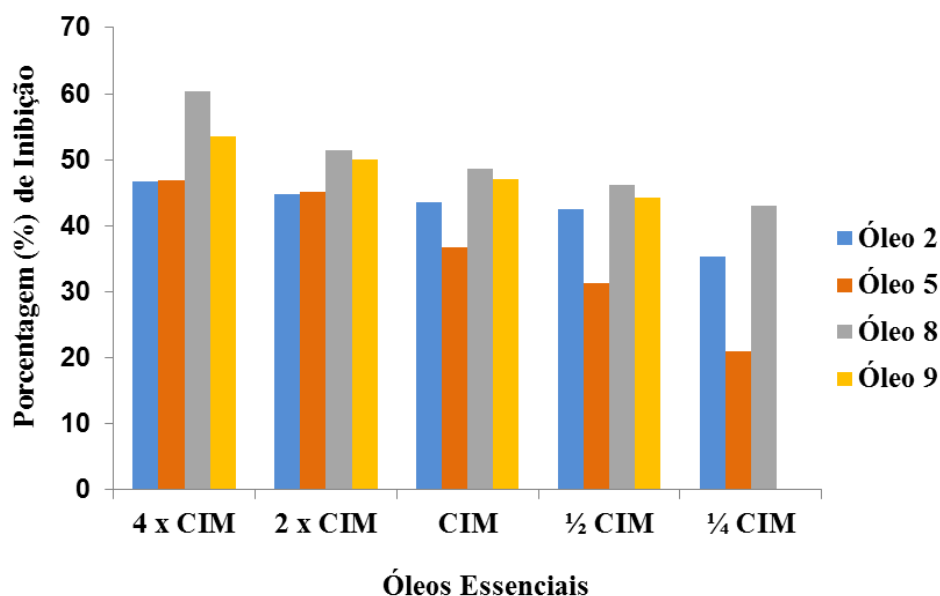
Quanto menor a concentração do óleo essencial utilizada para inibir o biofilme, mais forte é considerada a inibição. Nas figuras abaixo (Figuras 8, 9 e 10), estão representadas as atividades antibiofilme dos óleos essenciais de *C. zeylanicum* (2), *E. caryophyllata* (5), *O. vulgare* (8) e *Thymus vulgaris* (9) sobre *S. mutans*, *S. aureus* e *Enterococcus* sp.



**Figura 8** Porcentagem de inibição dos óleos essenciais de *C. zeylanicum* (2), *E. caryophyllata* (5), *O. vulgare* (8) e *T. vulgaris* (9) sobre o biofilme pré-formado de *Streptococcus mutans* utilizando valores de CIM (concentração inibitória mínima).



**Figura 9** Porcentagem de inibição dos óleos essenciais de *C. zeylanicum* (2), *E. caryophyllata* (5), *O. vulgare* (8) e *T. vulgaris* (9) sobre o biofilme pré-formado de *Staphylococcus aureus* utilizando valores de CIM (concentração inibitória mínima).



**Figura 10** Porcentagem de inibição dos óleos essenciais de *C. zeylanicum* (2), *E. caryophyllata* (5), *O. vulgare* (8) e *T. vulgaris* (9) sobre o biofilme pré-formado de *Enterococcus* sp. utilizando valores de CIM (concentração inibitória mínima).

Os resultados da atividade antibiofilme dos óleos essenciais sobre o biofilme pré-formado de *S. mutans* (Figura 8) indicaram que o óleo essencial de *T. vulgaris* (9) reduziu 72% do biofilme dessa espécie na maior concentração

testada, 4XCIM (5mg/mL), porém, sendo considerado um inibidor fraco. Por outro lado o óleo essencial de *E. caryophyllata* (5) inibiu o biofilme em todas as concentrações testadas, variando de 39,2% a 45,6% e apresentando dois valores de CIM fortes, sendo eles 0,312 mg/mL (1/2CIM) e 0,156 mg/mL (1/4CIM). Já o óleo essencial de *C. zeylanicum* (2) inibiu a o biofilme de *S. mutans* de 35,4% a 43,3% em quatro das cinco concentrações testadas sendo os quatro valores de CIM utilizados considerados fortes inibidores (0,312 mg/mL (2XCIM), 0,156 mg/mL (CIM), 0,078 mg/mL (1/2 CIM) e 0,039 mg/mL (1/4 CIM).

Os óleos essenciais de *C. zeylanicum* (2), *E. caryophyllata* (5), *O. vulgare* (8) e *Thymus vulgaris* (9) inibiram o biofilme pré-formado de *S. aureus* de 92,3% a 95% (Figura 9). O óleo essencial de *C. zeylanicum* (2) e *O. vulgare* (8) foram considerados inibidores fortes em duas concentrações utilizadas sendo elas 1/2 CIM (0,312 mg/mL) e 1/4 CIM (0,156 mg/mL) e o óleo de *E. caryophyllata* (5) e *Thymus vulgaris* (9) em uma concentração, correspondente a 1/4 CIM (0,312 mg/mL).

Para a bactéria *Enterococcus* sp. os óleos essenciais de *C. zeylanicum* (2), *E. caryophyllata* (5) e *O. vulgare* (8) apresentaram atividade antibiofilme em todas as concentrações testadas, tendo o óleo essencial de *C. zeylanicum* (2) apresentado inibição variando de 35%, a 47%, o óleo de *E. caryophyllata* (5) de 21% a 47% e o óleo de *O. vulgare* (8) de 43% a 60%. Já o óleo de *Thymus vulgaris* (9) não apresentou atividade na menor concentração testada, sendo sua maior inibição referente a 53% na maior concentração utilizada (Figura 10). O óleo de *O. vulgare* (8) e de *C. zeylanicum* (2) apresentaram duas inibições fortes sobre o biofilme de *Enterococcus* sp. sendo elas 1/2 CIM (0,312 mg/mL) e 1/4CIM (0,156 mg/mL).

No presente estudo, os óleos essenciais testados apresentaram atividade contra o biofilme pré-formado das três bactérias utilizadas e o melhor resultado foi obtido para a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 onde os quatro óleos inibiram em torno de 90% do seu biofilme.

A formação de biofilmes é um fator chave no estabelecimento e persistência de infecções causadas por microrganismos em seres humanos e em animais (Konto-Ghiorghi et al., 2009). Doenças da cavidade oral como cárie e a doença periodontal estão diretamente relacionadas com a capacidade das bactérias formarem biofilme (Rosan & Lamont, 2000).

A significativa inibição do biofilme de *S. aureus* em nosso estudo é um dado interessante frente a importância dessa espécie bacteriana, não só para a área odontológica mais para a área de saúde em geral já que *S. aureus* é uma bactéria normalmente comensal mais que pode causar doenças agudas e crônicas graves, com potencial risco de morte, sendo o tratamento com antibióticos frequentemente ineficaz devido ao desenvolvimento de estirpes resistentes (Otto, 2010; DeLeo et al., 2010).

Como em nosso estudo, Filoche e colaboradores (2005) avaliaram os efeitos do óleo essencial de *C. zeylanicum* sobre biofilme pré-formado de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. O biofilme pré-formado foi estabelecido em placa de microtitulação de 96 poços e incubado por 24 horas. Como resultado, os autores demonstraram que o óleo de *C. zeylanicum* apresentou significativa atividade contra o biofilme dessa espécie.

Ciandrini e colaboradores (2014) em estudo avaliando os efeitos do carvacrol, composto presente nos óleos essenciais de orégano e tomilho, sobre biofilmes pré-formados de patógenos orais entre eles *S. mutans* ATCC 25175 concluíram que esse composto mostrou atividade inibitória contra o biofilme da bactéria *S. mutans*. O eugenol, componente majoritário do óleo essencial de *E. caryophyllata* também reduziu biofilmes de *S. mutans* em estudo realizado por Adil e colaboradores (2014).

Nostro e colaboradores (2007) avaliaram a atividade antibiofilme do óleo de *O. vulgare* e dos compostos carvacrol e timol sobre estirpes de *Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus* isoladas a partir de infecções oculares onde os isolados foram cultivados em placas de microtitulação e incubados por 24 h para a formação do biofilme. O valor de CIB foi determinado, demonstrando que os óleos testados promoveram baixa formação de biofilme frente as estirpes utilizadas.

Na literatura é possível encontrar estudos demonstrando a efetiva atividade antibiofilme dos óleos essenciais de *T. vulgaris* (Vázquez-Sánchez et al., 2015) *O. vulgare* (Schillaci et al., 2013), *E. caryophyllata* e *C. zeylanicum* (Budri et al., 2015) sobre biofilmes de *S. aureus*.

#### 5.4. Avaliação da interação entre os óleos essenciais e a clorexidina

Para a avaliação da interação entre os óleos essenciais ativos e a clorexidina foi utilizado o método checkerboard, conhecido como tabuleiro de damas.

Na tabela abaixo (Tabela 5) encontra-se os resultados da interação entre os óleos de *C. zeylanicum* (2), *E. caryophyllata* (5), *O. vulgare* (8) e *T. vulgaris* (9) com a clorexidina sobre a bactéria *Streptococcus mutans*.

**Tabela 5** Interação entre os óleos essenciais ativos e a clorexidina sobre *Streptococcus mutans*.

Óleo essencial	Antisséptico bucal	CIF (Antis.)	CIF (óleo)	$\Sigma$ CIF	Interação
<i>C. zeylanicum</i>	PerioGard®	2	0,125	2,125	Indiferente
<i>E. caryophyllata</i>	PerioGard®	0,125	2	2,125	Indiferente
<i>O. vulgare</i>	PerioGard®	1	0,5	1,50	Indiferente
<i>T. vulgaris</i>	PerioGard®	0,125	0,125	0,25	Sinergismo

A interação entre óleos essenciais podem produzir diferentes efeitos, entre eles o sinergismo, que ocorre quando a combinação dos óleos é maior do que a soma dos efeitos individuais (Toroglu, 2011; Herman et al., 2016).

De acordo com o critério estabelecido para avaliar a interação entre os óleos essenciais e a clorexidina observou-se sinergia entre o óleo essencial de *T. vulgaris* (9) com clorexidina, com um  $\Sigma$ CIF de 0,25.

Esse resultado é muito interessante já que a clorexidina é um dos antissépticos bucais mais utilizados para prevenção e controle da placa dentária, porém seu uso diário pode desencadear efeitos colaterais indesejáveis como manchas nos dentes e na língua, perda do paladar e sensação de queimação na mucosa oral. Por isso, outras formulações têm sido desenvolvidas para melhora desses aspectos, mantendo-se o adequado controle da formação da placa bacteriana na cavidade oral (Marinho & Araujo 2007). Como a clorexidina é eficiente no controle da placa bacteriana uma associação desta com óleos essenciais que reconhecidamente possuem atividade antimicrobiana pode vir a reduzir a concentração de clorexidina usada e assim, minimizar seus efeitos colaterais.

A clorexidina tem sido associada a óleos essenciais para a observação

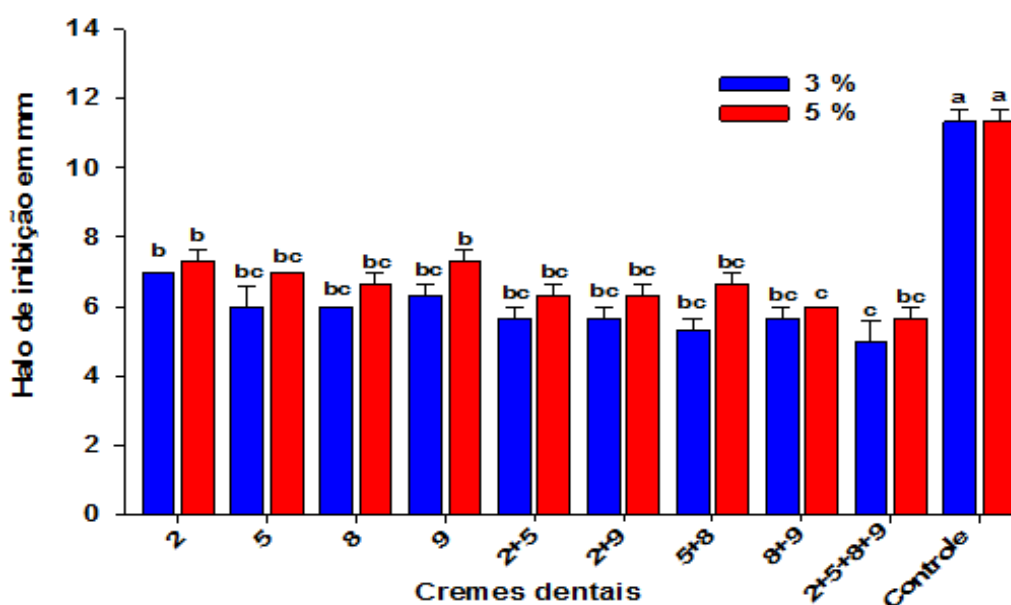
de sinergismo, como em estudo realizado por Hendry e colaboradores (2009) utilizando o ensaio de tabuleiro de damas, que concluiu que a clorexidina apresentou efeito sinérgico associado ao óleo de eucalipto e ao composto 1,8-cineol contra uma ampla gama de microrganismos nas formas planctônicas e sésseis, entre eles *Staphylococcus aureus*.

### 5.5. Avaliação da atividade antibacteriana dos cremes dentais

Os 18 cremes dentais foram avaliados em relação à atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar utilizando os microrganismos *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Lactobacillus* sp. e *Enterococcus* sp. Antes, porém, os cremes dentais foram diluídos e centrifugados para a retirada de partículas sólidas.

As Figuras 11, 12, 13 e 14 mostram os resultados dos testes de difusão em ágar para os cremes dentais com óleos essenciais nas concentrações de 3% e 5% e controle positivo (clorexidina) e a comparação entre as médias obtidas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

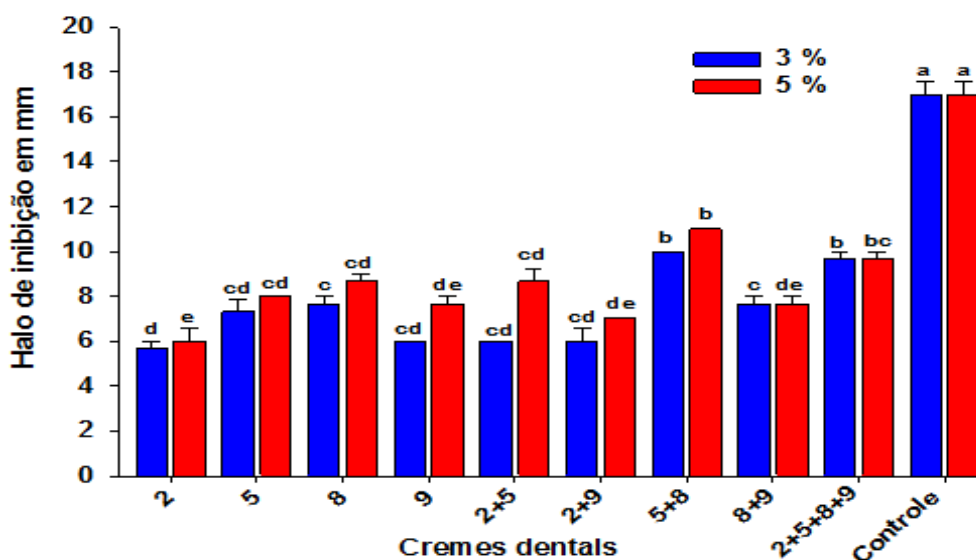
Como já descrito, halos de inibição acima de 6mm foram considerados como potencial atividade antibacteriana.



**Figura 11** Médias dos halos de inibição (milímetros) dos cremes dentais a 3% e 5% frente à bactéria *Streptococcus mutans*: *C. zeylanicum* (2), *E. caryophyllata* (5), *O. vulgare* (8), *T. vulgaris* (9).

De acordo com as análises estatísticas apresentadas na Figura 11, pode-se observar que a maioria dos cremes dentais, puros e em associações, não apresentaram diferenças estatísticas entre si frente à bactéria *S. mutans*. Apenas o creme dental com óleo essencial de orégano (8) + tomilho (9) a 5% e o creme dental com os quatro óleos associados a 3% apresentaram diferenças estatísticas, sendo considerados os tratamentos menos eficazes.

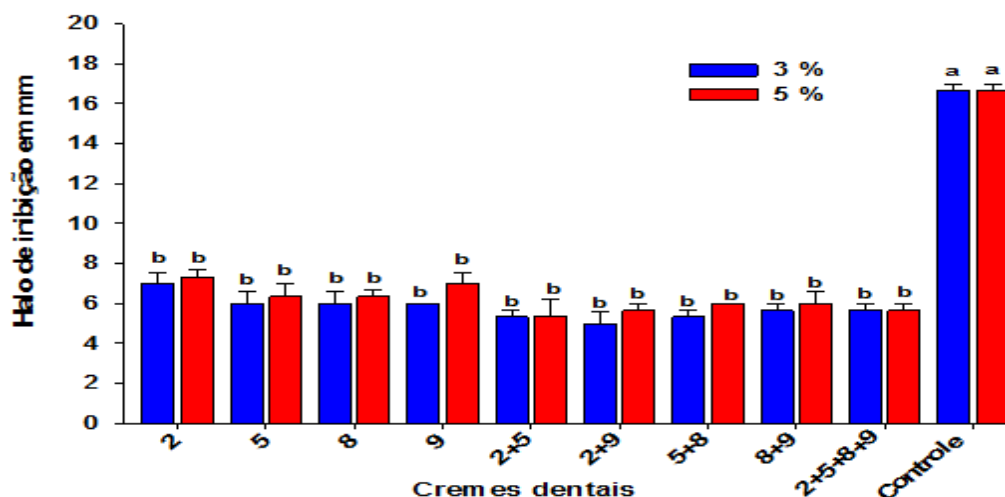
O critério estabelecido para avaliar a atividade antibacteriana evidenciou que os cremes dentais de canela (2) a 3% (7mm) e a 5% (7,3mm), cravo (5) a 5% (7mm), orégano (8) (6,66mm), tomilho (9) a 5% (7,3mm) e cravo (5) + orégano (8) (6,66mm) apresentaram significativo potencial de inibição.



**Figura 12** Médias dos halos de inibição (milímetros) dos cremes dentais a 3% e 5% frente à bactéria *Staphylococcus aureus*: *C. zeylanicum* (2), *E. caryophyllata* (5), *O. vulgare* (8), *T. vulgaris* (9).

Para a bactéria *S. aureus* a associação dos óleos essenciais de cravo (5) + orégano (8) nas concentrações de 3% e 5%, foram estatisticamente mais eficazes, seguidas pelos cremes dentais com a associação dos quatro óleos essenciais (Figura 12).

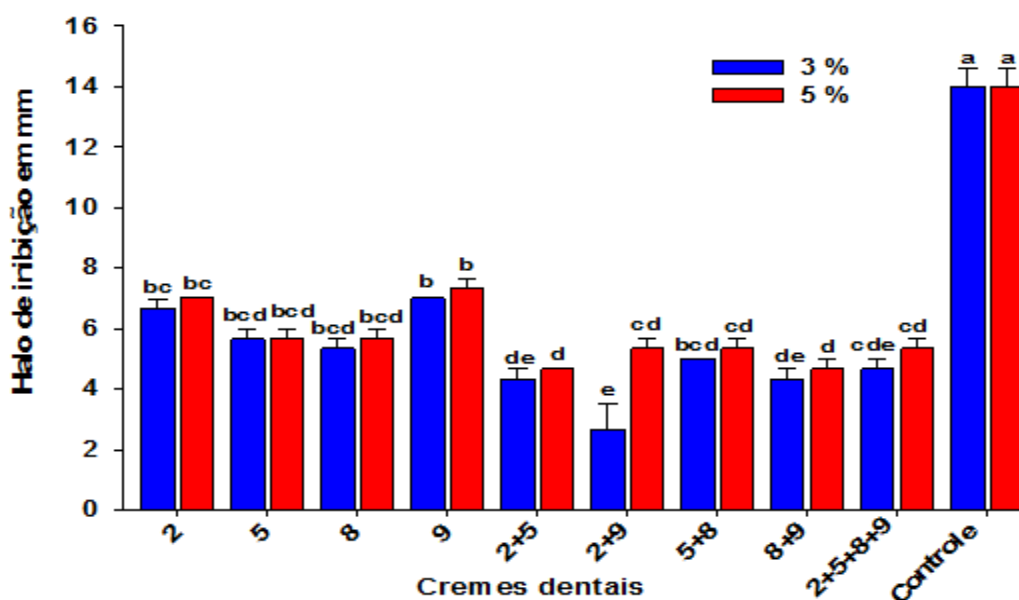
Quanto aos valores dos halos de inibição, treze dos 18 cremes dentais foram considerados com potencial atividade antibacteriana.



**Figura 13** Médias dos halos de inibição (milímetros) dos cremes dentais a 3% e 5% frente à bactéria *Lactobacillus* sp: *C. zeilanicum* (2), *E. caryophyllata* (5), *O. vulgare* (8), *T. vulgaris* (9).

Os cremes dentais mostraram similaridade de acordo com as análises estatísticas para inibição de *Lactobacillus* sp. (Figura 13).

No entanto, apenas os cremes dentais com óleo essencial de canela (2) a 3% (7mm) e 5% (7,3mm) e com o óleo essencial de tomilho (9) a 5% (7mm) foram considerados com potencial atividade antibacteriana.



**Figura 14** Médias dos halos de inibição (milímetros) dos cremes dentais a 3% e 5% frente à bactéria *Enterococcus* sp: *C. zeilanicum* (2), *E. caryophyllata* (5), *O. vulgare* (8), *T. vulgaris* (9).

Os cremes dentais que foram estatisticamente melhores para *Enterococcus* sp. foram os cremes dentais incorporados com óleo de tomilho

(9) a 3% e 5%, seguidos pelos cremes dentais com óleos de canela (2) (3% e 5%), cravo (5) (3% e 5%), orégano (8) (3% e 5%) e cravo (5) + orégano (8) (3%). (Figura 14).

Os cremes dentais de canela (2) a 5% (7mm) e tomilho (9) a 3% (7mm) e a 5% (7,3mm) foram considerados com significativa ação antibacteriana, devido aos seus halos de inibição estarem acima de 6mm.

O uso de fitoterápicos naturais com atividade antibacteriana pode contribuir para o controle do crescimento microbiano na cavidade oral, minimizando os transtornos causados pelo uso de antibacterinaos sintéticos (Salgado et al., 2006).

Oliveira e colaboradores (2008) utilizando o método de difusão em ágar avaliou a atividade antibacteriana dos OEs de *Cymbopogon citratus* (capim limão), *Eugenia caryophyllata* (cravo) e *Cinnamomum zeylanicum* (canela) puros e incorporados a géis dentais sobre as bactérias cariogênicas *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Lactobacillus casei* isolado a partir do produto lácteo Yakult 40 e demonstraram que tanto os óleos essenciais quanto os géis inibiram ambas as bactérias. A média do halo de inibição do gel dentifrício contendo óleo essencial de cravo foi de 7mm para a bactéria *S. mutans*, sendo o mesmo halo de inibição encontrado no presente estudo.

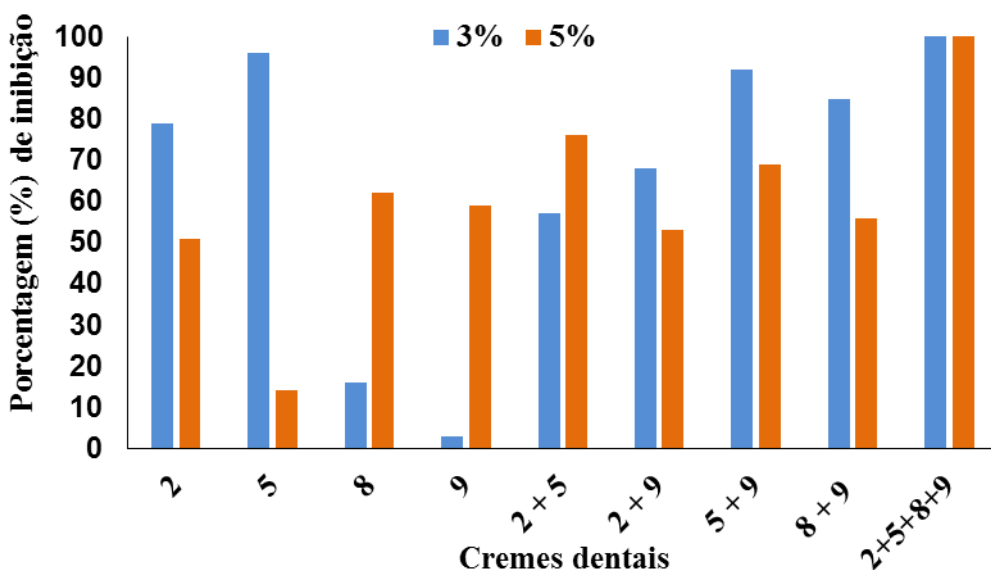
Estudo *in vitro* realizado por Gonçalves e colaboradores (2011) utilizando o ensaio de diluição em caldo concluiu que o óleo essencial de tomilho e cremes dentais incorporado com óleo de tomilho a 1%, 5% e 10% apresentaram atividade antibacteriana contra a bactéria *Streptococcus mutans* ATCC 25175, sendo observadas atividades inibitórias em ambas as concentrações.

A eficácia dos cremes dentais utilizados em nosso estudo ocorreu em ambas as concentrações, o que é interessante visto que a menor concentração pode ser considerada viável tanto em termos de custo como em termos de palatabilidade.

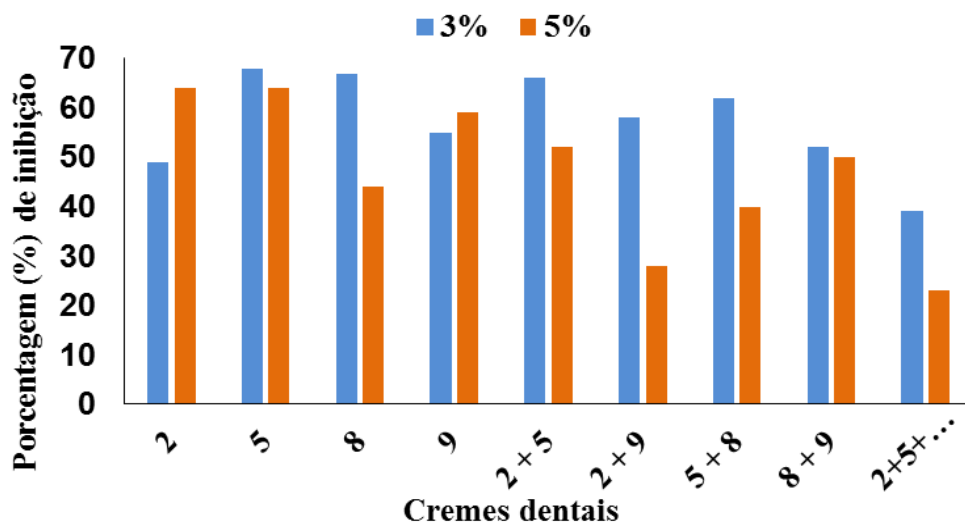
## **5.6. Avaliação dos cremes dentais sobre o biofilme bacteriano pré-formado**

A avaliação dos cremes dentais nas concentrações 3% e 5% foi realizada com os biofilmes pré-formados das bactérias *Streptococcus mutans*

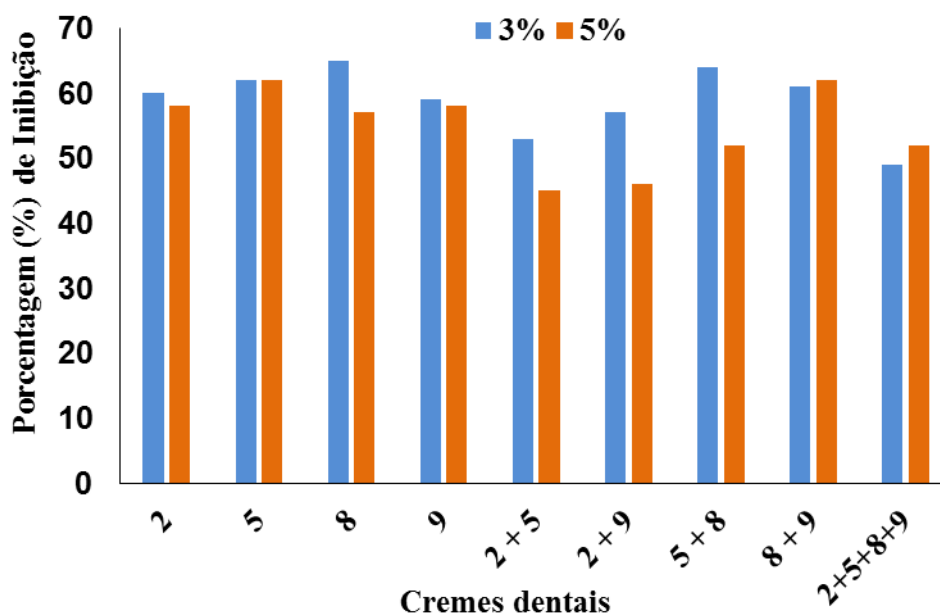
ATCC 25175, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus* sp. Os resultados estão expressos nas figuras 15, 16 e 17.



**Figura 15** Porcentagem de inibição dos cremes dentais a 3% e 5% sobre o biofilme pré-formado de *Streptococcus mutans*: *C. zeilanicum* (2), *E. caryophyllata* (5), *O. vulgare* (8), *T. vulgaris* (9).



**Figura 16** Porcentagem de inibição dos cremes dentais a 3% e 5% sobre o biofilme pré-formado de *Staphylococcus aureus*: *C. zeilanicum* (2), *E. caryophyllata* (5), *O. vulgare* (8), *T. vulgaris* (9).



**Figura 17** Porcentagem de inibição dos cremes dentais a 3% e 5% sobre o biofilme pré-formado de *Enterococcus* sp.: *C. zeylanicum* (2), *E. caryophyllata* (5), *O. vulgare* (8), *T. vulgaris* (9).

Para os testes de atividade de inibição do biofilme pré-formado dos cremes dentais contra a bactéria *S. mutans* (Figura 15) observou-se que os cremes dentais com a associação dos quatro óleos essenciais foi muito eficaz, inibindo 100% do biofilme, seguido pelo creme dental contendo óleo de cravo (5) a 3% (96%) e a associação de cravo (5) + tomilho (9) a 3% (92%).

Os cremes dentais que apresentaram maior atividade contra o biofilme de *S. aureus* (Figura 16) foram os que continham óleo de cravo (5) a 3% (68%) e 5% (64%), orégano (8) a 3% (67%), canela (2) + cravo (5) a 3% (66%) e cravo (5) + orégano (8) a 3% (62%). De modo geral, 12 dos 18 cremes dentais inibiram em mais de 50% o biofilme de *S. aureus*.

Para inibição do biofilme pré-formado de *Enterococcus* sp. (Figura 17), os cremes dentais mais ativos foram os de orégano (8) a 3% (65%) e cravo (5) + orégano (8) a 3% (64%), porém todos os cremes dentais obtiveram mais de 45% de ação sobre o biofilme dessa espécie.

A comparação dos resultados dos testes com os cremes dentais utilizados no presente estudo com trabalhos da literatura se torna difícil devido a escassez de estudos semelhantes, porém, estudos com cremes dentais contendo óleos essenciais e extratos visando atividades antibiofilmes tem

apresentado resultados promissores, como o estudo realizado por Shayegh e colaboradores (2008) que verificaram que a incorporação de óleos essenciais de *Mentha piperita* (hortelã-pimenta) e *Cuminum cyminum* (cominho) a cremes dentais reduziu o biofilme dental de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus pyogenes* em estudo in vivo. Já Santamaria e colaboradores (2014) demonstraram que gel dental contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* foi eficaz na redução do biofilme dental e do número de colônias de bactérias cariogênicas.

Enxaguatórios bucais à base do extrato de aroeira e do extrato de camomila mostraram-se eficazes no controle da placa bacteriana, bem como no tratamento da gengivite crônica em estudo in vivo realizado por Lins e colaboradores (2013).

No presente estudo foi observado que ambas as concentrações de cremes dentais (3% e 5%) foram eficazes contra as bactérias cariogênicas, o que indica que a concentração não influenciou a atividade biológica. Gonçalves e colaboradores (2011) também concluíram que a menor concentração (1%) do creme dental contendo óleo essencial de *Thymus vulgaris* foi tão eficaz quanto as concentrações maiores (5% e 10%) em estudo in vitro utilizando cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

## 5.7. Análise cromatográfica dos óleos essenciais

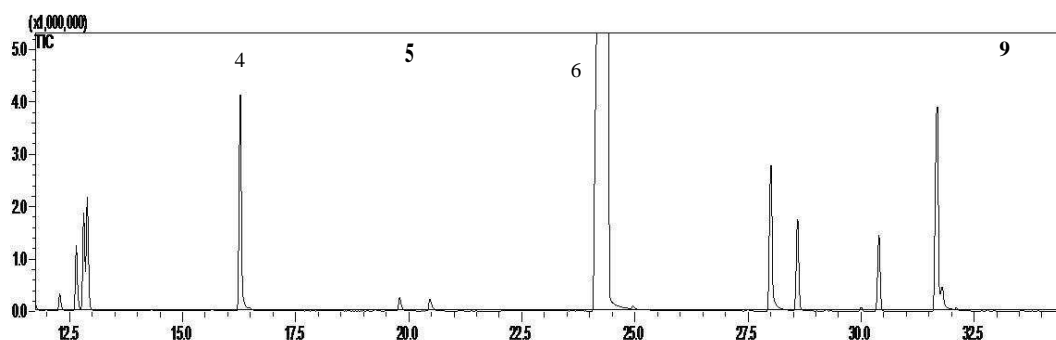
Na tabela abaixo (Tabela 5) estão descritos os principais componentes majoritários dos treze óleos essenciais utilizados no presente estudo.

**Tabela 6** Principais componentes dos óleos essenciais estudados.

Nome comum	Nome científico (família)	Componentes majoritários
Alecrim (1)	<i>Rosmarinus officinalis</i> (Labiatae)	1,8-cineol (41,2%), $\alpha$ -pineno (14,3%), canfora (11,4%).
Canela (2)*	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (Lauraceae)	E-cinamaldeído (69,65%), acetato de cinamila (6,60%), $\beta$ -linalol (5,85%).
Melaleuca (3)	<i>Melaleuca alternifolia</i> (Myrtaceae)	Terpinen-4-ol (47,14%), $\gamma$ -terpineno (21,63%), 4-(+)-careno (8,50%).
Noz moscada (4)	<i>Myristica fragrans</i> (Myristicaceae)	Sabineno (19,9%), $\alpha$ -pineno (16,4%), miristicina (15,0%).
Cravo (5)*	<i>Eugenia caryophyllus</i> (Myrtaceae)	Eugenol (90,84%), cariofileno (6,60%), $\alpha$ -cariofileno (1,12%).
Gengibre (6)	<i>Zingiber officinale</i> (Zingiberaceae)	Zingibereno (33%), $\beta$ -sesquifelandreno (12%), $\beta$ -bisaboleno (10%), canfeno (8%), mirceno (7%).
Laranja (7)	<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)	Limoneno (95,48%), mirceno (2,10%).
Orégano (8)*	<i>Origanum vulgare</i> (Lamiaceae)	Carvacrol (46,81%), p-cimeno (17%), cariofileno (6,64%), timol (6,62%).
Tomilho (9)*	<i>Thymus vulgaris</i> (Lamiaceae)	Timol (48,43%), p-cimeno (28,81%), $\beta$ -linalol (6,05%), $\gamma$ -terpineno (3,85%).
Tangerina (10)	<i>Citrus reticulata</i> (Rutaceae)	d-limoneno (87,44%), m-cimeno (5,91%), miraceno (1,28%).
Lima (11)	<i>Citrus aurantifolia</i> (Rutaceae)	d-limoneno (54,10%), $\beta$ -pineno (13,59%), $\gamma$ -terpineno (12,64%).
Eucalipto limao (12)	<i>Eucalyptus citriodora</i> (Myrtaceae)	Citronelal (73,37%), citronelol (6,93%), dl-isopulegol (6,41%).
Hortelã-pimenta (13)	<i>Mentha Piperita</i> (Lamiaceae)	Mentol (55%), mentona (25%), acetato de metilo (10%).

\*Óleos essenciais ativos

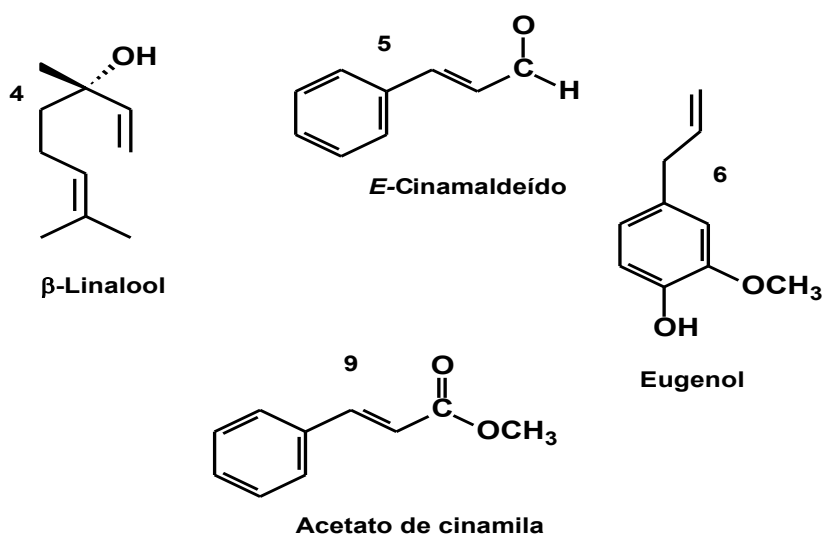
### 5.7.1 Cromatograma do óleo essencial *Cinnamomum zeylanicum* (Canela)



**Figura 18** Cromatograma do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum*.

**Tabela 7** Principais componentes encontrados no óleo essencial de *C. zeylanicum*.

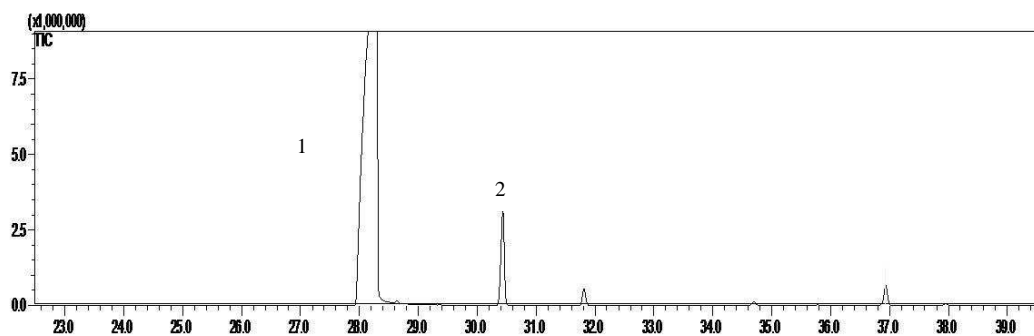
Pico	Tr (min)	Composto	Índice de similaridade (%)	%	IK	IK*
1	12.649	o-cimeno	97%	1.51	1.017	1.016 [1]
2	12.813	beta-felandreno	92%	1.29	1.021	1.023 [2]
3	12.891	eucaliptol	96%	1.40	1.023	1.025 [3]
4	16.274	$\beta$ -linalol	97%	5.85	1.095	1.098 [1]
5	24.403	E-cinamaldeído	97%	69.65	1.272	1.268 [4]
6	28.008	eugenol	97%	4.94	1.354	1.356 [5]
7	28.596	$\alpha$ -copaeno	93%	2.67	1.368	1.376 [5]
8	30.393	$\beta$ -cariofileno	96%	2.23	1.410	1.418 [5]
9	31.683	acetato de cinamila	96%	6.60	1.442	1.443 [5]



**Figura 19** Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *C. zeylanicum*.

- [1] Choi, H.-S. 2003a. Character impact odorants of citrus hallabong [(C. unshiu Marcov x C. sinensis Osbeck) x C. reticulata Blanco] cold-pressed peel oil. *J. Agric. Food Chem.* 51:2687-2692.
- [2] Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoyanova, A.S., Georgiev, E.V., and Damianova, S.T. 2003a. Composition, quality control, and antimicrobial activity of the essential oil of long-time stored dill (*Anethum graveolens* L.) seeds from Bulgaria. *J. Agric. Food Chem.* 51:3854-3857.
- [3] Chisholm, M.G., Wilson, M.A., and Gaskey, G.M. 2003a. Characterization of aroma volatiles in key lime essential oils (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Flavour Fragr. J.* 18:106-115.
- [4] Caredda, A., Marongiu, B., Porcedda, S., and Soro, C. 2002. Supercritical carbon dioxide extraction and characterization of *Laurus nobilis* essential oil. *J. Agric. Food Chem.* 50:1492-1496.
- [5] Adams, R.P. 1995. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.

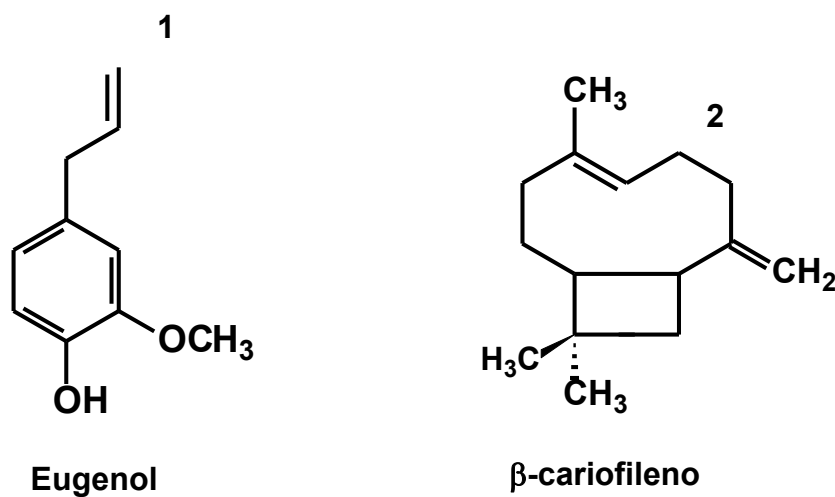
### 5.7.2 Cromatograma do óleo essencial de *Eugenia caryophyllata* (Cravo)



**Figura 20** Cromatograma do óleo essencial de *Eugenia caryophyllata*.

**Tabela 8** Principais componentes encontrados no óleo essencial de *E. caryophyllata*.

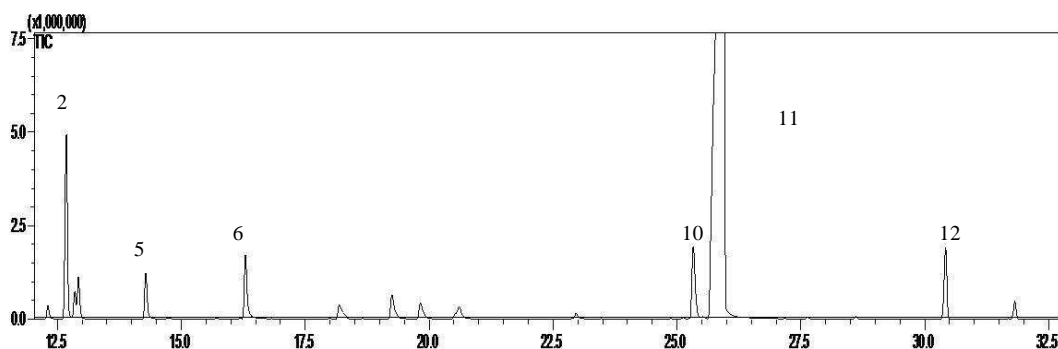
Pico	Tr (min)	Composto	Índice de similaridade (%)	%	IK	IK*
1	28.289	eugenol	97%	90.84	1.361	1.356 [1]
2	30.434	$\beta$ -cariofileno	96%	6.60	1.411	1.418 [1]
3	31.813	$\alpha$ -cariofileno	96%	1.12	1.445	1.444 [2]
4	36.936	Óx. de cariofileno	94%	1.20	1.567	1.572 [3]



**Figura 21** Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *E. caryophyllata*.

- [1] Adams, R.P. 1995. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.
- [2] Choi, H.-S. 2003a. Character impact odorants of citrus hallabong [(C. unshiu Marcov x C. sinensis Osbeck) x C. reticulata Blanco] cold-pressed peel oil. J. Agric. Food Chem. 51:2687-2692.
- [3] Chisholm, M.G., Wilson, M.A., and Gaskey, G.M. 2003a. Characterization of aroma volatiles in key lime essential oils (*Citrus aurantifolia* Swingle). Flavour Fragr. J. 18:106-115.

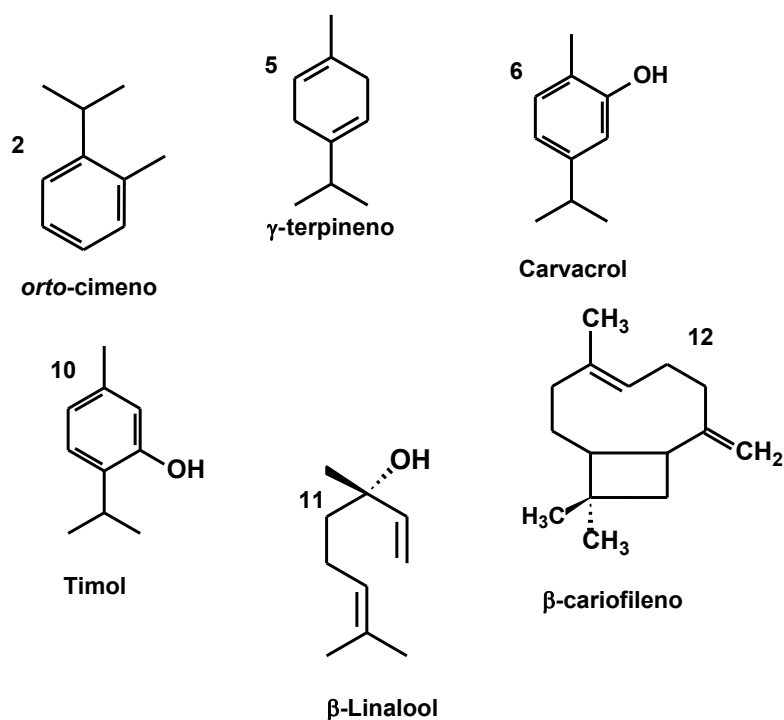
### 5.7.3 Cromatograma do óleo essencial *Origanum vulgare* (Orégano)



**Figura 22** Cromatograma do óleo essencial de *Origanum vulgare*.

**Tabela 9** Principais componentes encontrados no óleo essencial de *O. vulgare*.

Pico	Tr (min)	Composto	%	Índice de similaridade (%)	IK	IK *
1	10.459	$\beta$ -pineno	2.64	94%	968	964 [1]
2	12.680	o-cimeno	17.00	97%	1.018	1.016 [2]
3	12.852	d-limoneno	1.58	96%	1.022	1.031 [3]
4	12.926	eucaliptol	2.75	96%	1.023	1.025 [4]
5	14.283	$\gamma$ -terpineno	4.27	97%	1.053	1.055 [5]
6	16.296	$\beta$ -linalol	5.83	97%	1.096	1.098 [2]
7	18.189	Cânfora	1.24	96%	1.136	1.139 [5]
8	19.249	(1S)-borneol	2.20	97%	1.159	1.160 [6]
9	19.823	terpinen-4-ol	1.30	97%	1.171	1.178 [7]
10	25.328	timol	6.62	97%	1.292	1.290 [8]
11	25.942	carvacrol	46.81	95%	1.306	1.299 [9]
12	30.418	$\beta$ -cariofileno	6.64	96%	1.410	1.418 [10]
13	31.812	B-humuleno	1.60	96%	1.445	1.440 [10]
14	36.938	óxido de cariofileno	2.28	93%	1.574	1.572 [4]



**Figura 23** Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *O. vulgare*.

- [1] Engel, E., Baty, C., LeCorre, D., Souchon, I., and Martin, N. 2002. Flavor-active compounds potentially implicated in cooked cauliflower acceptance. *J. Agric. Food Chem.* 50:6459-6467. [2] Choi, H.-S. 2003a. Character impact odorants of citrus hallabong [(*C. unshiu* Marcov x *C. sinensis* Osbeck) x *C. reticulata* Blanco] cold-pressed peel oil. *J. Agric. Food Chem.* 51:2687-2692. [3] Jordan, M.J., Margaria, C.A., Shaw, P.E., and Goodner, K.L. 2002. Aroma active components in aqueous Kiwi fruit essence and Kiwi fruit puree by GC-MS and multidimensional GC/GC-O. *J. Agric. Food Chem.* 50:5386-5390. [4] Chisholm, M.G., Wilson, M.A., and Gaskey, G.M. 2003a. Characterization of aroma volatiles in key lime essential oils (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Flavour Fragr. J.* 18:106-115. [5] Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoyanova, A.S., Georgiev, E.V., and Damianova, S.T. 2003a. Composition, quality control, and antimicrobial activity of the essential oil of long-time stored dill (*Anethum graveolens* L.) seeds from Bulgaria. *J. Agric. Food Chem.* 51:3854-3857. [6] Ekundayo, O., Laakso, I., Adegbola, R.-M., Oguntimein, B., Sofowora, A., and Hiltunen, R. 1988. Essential oil constituents of Ashanti pepper (*Piper guineense*) fruits (berries). *J. Agri. Food Chem.* 36:880-882.

- [7] Hognadottir, A., and Rouseff, R.L. 2003. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography - olfactometry and gas chromatography - mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 998:201-211.
- [8] Pino, J.A., Mesa, J., Munoz, Y., Marti, M.P., and Marbot, R. 2005. Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 53:2213-2223.
- [9] Varda-Uenlue, G., Candan, F., Soekmen, A., Daferera, D., Polissiou, M., Soekmen, M., Doenmez, E., and Tepe, B. 2003. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. var. *pectinatus* (Lamiaceae). *J. Agric. Food Chem.* 51:63-67.
- [10] Adams, R.P. 1995. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.

### 5.7.4 Cromatograma do óleo essencial *Thymus vulgaris* (Tomilho branco)

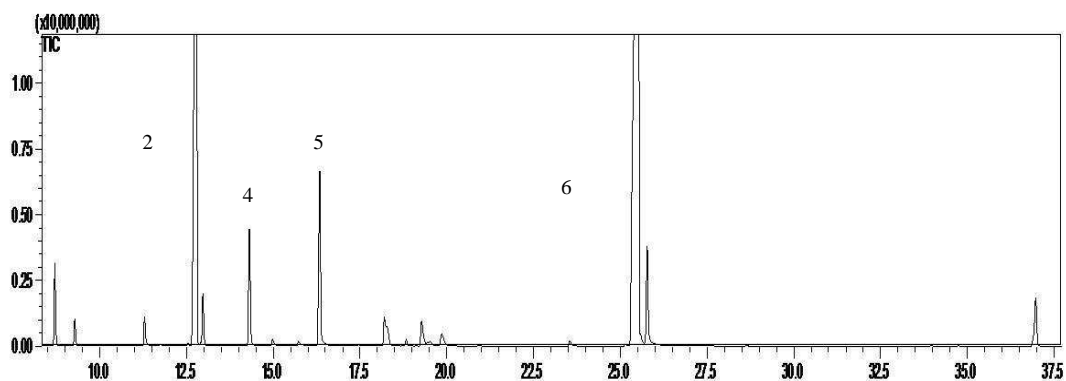


Figura 24 Cromatograma do óleo essencial de *Thymus vulgaris*.

Tabela 10 Principais componentes encontrados no óleo essencial de *T. vulgaris*

Pico	T <sub>R</sub> (min)	Composto	%	Índice de similaridade (%)	IK	IK *
1	8.706	α-pineno	2.10	97	926	926 [1]
2	12.781	o-cimeno	28.81	96	1.020	1.016 [2]
3	12.972	eucaliptol	1.33	96	1.024	1.039 [3]
4	14.315	γ-terpineno	3.85	97	1.053	1.074 [3]
5	16.342	β-linalol	6.05	98	1.097	1.098 [2]
6	25.521	timol	48.43	97	1.296	1.290 [4]
7	25.773	carvacrol	2.83	95	1.302	1.299 [5]

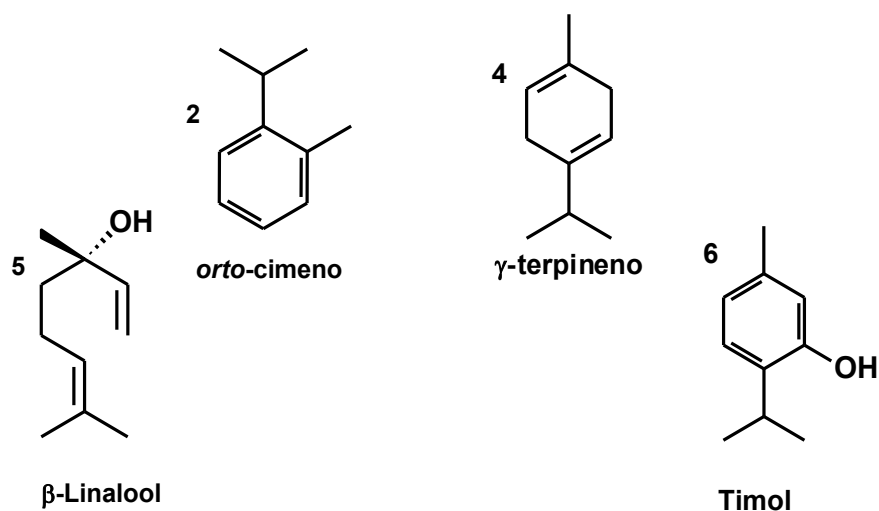


Figura 25 Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *T. vulgaris*

- [1] Chisholm, M.G., Wilson, M.A., and Gaskey, G.M. 2003a. Characterization of aroma volatiles in key lime essential oils (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Flavour Fragr. J.* 18:106-115.
- [2] Choi, H.-S. 2003a. Character impact odorants of citrus hallabong [(*C. unshiu* Marcov x *C. sinensis* Osbeck) x *C. reticulata* Blanco] cold-pressed peel oil. *J. Agric. Food Chem.* 51:2687-2692.
- [3] Hognadottir, A., and Rouseff, R.L. 2003. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography - olfactometry and gas chromatography - mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 998:201-211.
- [4] Pino, J.A., Mesa, J., Munoz, Y., Marti, M.P., and Marbot, R. 2005. Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 53:2213-2223.
- [5] Varda-Uenlue, G., Candan, F., Soekmen, A., Daferera, D., Polissiou, M., Soekmen, M., Doenmez, E., and Tepe, B. 2003. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. var. *pectinatus* (Lamiaceae). *J. Agric. Food Chem.* 51:63-67

No presente estudo, os resultados das análises cromatográficas dos óleos essenciais demonstraram que os principais compostos do óleo essencial de *C. zeylanicum* foram E-cinamaldeído (69,65%), acetato de cinamila (6,60%), beta-linalol (5,85%) e eugenol (4,94%) (Figura 19 e Tabela 7).

Andrade e colaboradores (2012) identificaram 14 constituintes no óleo essencial das cascas da *C. zeylanicum*, sendo os fenilpropanóides (E)-cinamaldeído (77,72%) e acetato de (E)-cinamila (5,99%) os componentes mais abundantes. Estes dados se assemelham aos encontrados no presente estudo. Feniman e colaboradores (2012) também encontraram uma porcentagem do composto cinamaldeído (67,58%) semelhante. Da mesma forma, Unlu e colaboradores (2010) identificaram como componente majoritário do óleo essencial de *C. zeylanicum* o cinamaldeído, perfazendo 68,95% da constituição do óleo.

Os componentes majoritários do óleo de *E. caryophyllata* encontrados no presente estudo foram eugenol (90,84%) e  $\beta$ -cariofileno (6,60%) (Figura 21 e Tabela 8).

De forma semelhante ao presente trabalho, Maida e colaboradores (2014) identificaram como metabolitos principais do óleo essencial de *E. caryophyllata* (5) o composto eugenol (85%), um fenilpropanóide típico, e o composto  $\beta$ -cariofileno (9%), um hidrocarboneto sesquiterpenico. Também, Pereira e colaboradores (2008) encontraram como componente mais abundante do óleo essencial de *E. caryophyllata* o composto eugenol, perfazendo 86,3% da constituição do óleo. Da mesma forma, Silvestri e colaboradores (2010) identificaram o eugenol (90,3%) e  $\beta$ -cariofileno (4,83%) como componentes majoritários do óleo essencial de *E. caryophyllata*.

O óleo essencial de *O. vulgare* (8) apresentou como componentes mais abundantes os compostos carvacrol (46,81%) e o-cimeno (17,00%) (Figura 23 e Tabela 9). Novák e colaboradores (2003) investigando componentes do óleo essencial de *O. vulgare* de diferentes origens, identificaram o composto carvacrol como majoritário, tendo duas das amostras apresentado valores de carvacrol (44,2% e 53,5%) semelhantes aos encontrados no presente estudo (Figura 23 e tabela 8).

Já o óleo essencial de *T. vulgaris* apresentou os compostos timol (48,43%), p-cimeno (28,81%),  $\beta$ -linalol (6,05%),  $\gamma$ -terpineno (3,85%), carvacrol (2,83%) e  $\alpha$ -pineno (2,10%) como componentes abundantes (Figura

25 e Tabela 10), assim como reportado por Carvalho e colaboradores (2015) que identificaram os compostos timol (43,19%), p-cimeno (28,55%),  $\gamma$ -terpineno (6,36%), linalol (5,57%), carvacrol (3,14%) e  $\alpha$ -pineno (2,60%) e Höferl e colaboradores (2009) que encontraram os compostos timol (43,4%), p-cimeno (23,5%) e o carvacrol (4,1%), como componentes majoritários.

Existe uma variabilidade na composição química do óleo essencial de *T. vulgaris* que poderia ser explicada devido a existência de quimiotipos diferentes (De Lisi et al., 2011). O quimiotipo consiste em uma variação biológica do mesmo óleo essencial e o quimiotipo usado neste trabalho se caracteriza por uma quantidade elevada do composto timol. (Ballester-Costa et al., 2013).

Alguns autores relatam que as atividades biológicas de óleos essenciais estão relacionadas com a atividade dos componentes majoritários. De fato, diversos estudos demonstraram que esses compostos apresentaram atividade quando testados separadamente, porém, essas atividades também podem ser atribuídas a possíveis interações entre todos os componentes (Bassolé et al., 2010; Herman et al., 2016).

Desta forma, estudos que envolvem atividades antimicrobianas de produtos naturais devem conter, de preferência, as análises químicas das substâncias testes, pois assim se torna possível identificar os componentes majoritários e a associação com as atividades biológicas (Simões et al., 2004).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *O. vulgare* e *T. vulgaris* é atribuída principalmente ao carvacrol e timol, que exibem significativa atividade quando testados separadamente, atuando, principalmente, na parede celular, modificando sua permeabilidade e causando a perda de material celular tais como ATP e ácido nucleico (Marino et al., 2001; Friedman et al., 2002; Burt, 2004, Trombetta et al., 2005). Timol e carvacrol apresentam estrutura semelhante, porém eles diferem quanto à localização do grupo hidroxila no anel fenólico (Lambert et al., 2001).

Em relação ao óleo essencial de *C. zeylanicum*, podemos observar relatos de maior quantidade de cânfora na casca de raízes, eugenol nas folhas, e cinamaldeído na casca, sugerindo diferentes perfis de atividade (Gruenwald et al., 2010). Os componentes majoritários, entre eles cinamaldeído e eugenol, atuam principalmente provocando danos à estrutura da parede bacteriana. Já o óleo essencial de *E. caryophyllata* (5) tem sua atividade biológica atribuída à presença de eugenol, que tem demonstrado propriedades analgésicas, anti-

inflamatória e antibacteriana (Matan et al., 2006; Hemaiswarya & Doble, 2009; Rhayour et al., 2003; Yehouenou et al., 2012).

## 6. CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de *C. zeylanicum* (2), *O. vulgare* (8) e *T. vulgaris* (9) inibiram todas as bactérias cariogênicas utilizadas no presente estudo pelo método de difusão em ágar, sendo elas *S. mutans* ATCC 25175, *S. aureus* ATCC 25923, *Lactobacillus* sp. e *Enterococcus* sp. Os menores valores da CIM foram obtidos pelos OEs de *C. zeylanicum* (2) para *S. mutans*, *T. vulgaris* (9) para *Lactobacillus* sp. e pelos óleos de *C. zeylanicum* (2) e *O. vulgare* (8) para *S. aureus* e *Enterococcus* sp. Em relação a atividade antibiofilme os óleos essenciais de *C. zeylanicum* (2) e *E. caryophyllata* (5) foram os mais eficazes contra *S. mutans*, os quatro óleos ativos mais ativos contra o biofilme de *S. aureus* e *C. zeylanicum* (2) e *O. vulgare* (8) foram os mais eficazes contra biofilme de *Enterococcus* sp.

No teste de sinergismo foi verificada a presença de sinergia entre o óleo de *T. vulgaris* (9) associado a clorexidina.

Em relação aos cremes dentais observamos que a atividade antibacteriana e antibiofilme dos mesmos não foram dependentes da concentração visto que os cremes dentais em ambas as concentrações utilizadas (3% e 5%) apresentaram atividades biológicas significativas. De forma geral, as associações não potencializaram os efeitos dos cremes dentais e as atividades biológicas tanto dos cremes dentais quanto dos óleos essenciais variaram de acordo com o teste utilizado e a bactéria testada.

Concluimos com o presente estudo que os óleos essenciais de *C. zeylanicum* (2), *E. caryophyllata* (5), *O. vulgare* (8) e *T. vulgaris* (9) apresentaram atividade antibacteriana e antibiofilme contra bactérias cariogênicas tanto puros quanto incorporados aos cremes dentais, sendo considerados agentes promissores para o emprego em produtos de higiene oral. Entretanto, estudos mais detalhados *in vitro* e *in vivo* bem como estudos de avaliação de toxicidade devem ser realizados visando uma possível aplicação profilática e/ou terapêutica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAS, J.A.; PASTER, B.J.; STOKES, L.N.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F.E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol*, v.43, p.5721-5732, 2005.

AAS, J.A.; GRIFFEN, A.L.; DARDIS, S.R.; LEE, A.M.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F.E.; LEYS, E.J.; PASTER, B.J. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J. Clin. Microbiol*, v.46, p.1407-1417, 2008.

ABAD, M.; ANSUATEGUI, M.; BERMEJO, P. Active antifungal substances from natural sources. *Arkivoc*, v.7, p.116-145, 2007.

ABANTO, J.; CARVALHO, T.S.; MENDES, F.M.; WANDERLEY, M.T.; BONECKER, M.; RAGGIO, D.P. Impact of oral diseases and disorders on oral health-related quality of life of preschool children. *Com. Dent Oral Epid*, v.39, p.105-14, 2011.

ADIL, M.; SINGH K.; VERMA P.K.; KHAN A.U. Eugenol-induced suppression of biofilm-forming genes in *Streptococcus mutans*: an approach to inhibit biofilms, *J. Glob. Antimicrob. Resist*, v.2, p.286-292, 2014.

AGRA, M.F.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacog*, v.17, p.114-140, 2007.

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B. COMPOSITION and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem*, v.40, p.4168-4170, 2001.

ALIMPIĆ, A.; PLJEVLJAKUŠIĆ, D.; ŠAVIKIN, K.; KNEŽEVIĆ, A.; ĆURČIĆ, M.; VELIČKOVIĆ, D.; STEVIĆ, T.; PETROVIĆ, G.; MATEVSKI, V.; VUKOJEVIĆ, J.; MARKOVIĆ, S.; MARIN, P.D.; DULETIĆ-LAUŠEVIĆ, S. Composition and biological effects of *Salvia ringens* (Lamiaceae) essential oil and extracts. *Ind. Crop. Prod.*, v.76, p.702-709, 2015.

ALLAKER, R.P.; DOUGLAS, C.W. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. *Int. J. Antimic. Agents*, v.33, p.08-13, 2009.

ANDRADE, B.F.M.T.; BARBOSA, L.N.; PROBST, I.S.; FERNANDES JUNIOR, A. Antimicrobial activity of essential oils. *J. Essent. Oil Res.*, v.26, p.34-40, 2014.

ANDRADE, M.A.; CARDOSO, M.G.; BATISTA, L.R.; MALLET, A.C.T.; MACHADO, S.M.F. ESSENTIAL oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* and *Zingiber officinale*: composition, antioxidant and antibacterial activities. *Rev. Ciênc. Agron.*, v.43, p.399-408, 2012.

ANDREOLLI, R.S.; LARA, E.H.G. Avaliação "in vitro" da eficácia de enxaguatórios bucais remineralizantes. *Infarma*, v.16, p.7-8, 2004.

AREIAS, C.M.; MACHO, V.; RAGGIO, D.; GUIMARÃES, H.; ANDRADE, D.J.C.; Cárie precoce da infância - o estado da arte. *Ac. Pediátr. Port.*, v.41, p.217-221, 2010.

ATANASOV, A.G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.M., LINDER, T.; WAWROSCHEK, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E.H.; ROLLINGER, J.M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J.M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M.D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V.M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotech. Adv.*, v.33, p.1582-1614, 2015.

AZEVEDO, S.K.S.; SILVA, I.M. Comercialização de plantas medicinais e de uso religioso no município do Rio de Janeiro. *Ac Bot. Bras.*, v.20, p.185-194, 2006.

BABY, A.R.; MACIEL, C.P.M.; SALGADO-SANTOS, I.M.N.; DIAS, T.C.S.; KANECO, T.M.; CONSIGLIERI VO. Uso de extratos de plantas em produtos cosméticos. *Cosmet. Toilet*, v.17, p.79-82, 2005.

BADET, C.; THEBAUD, N.B. Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. *Open Microbiol. J*, v.2, p.38-48, 2008.

BAGRAMIAN, R.A.; FRANKLIN, G.G.; ANTHONY, R.V. The global increase in dental caries. A pending public health crisis. *Am. J. Dent*, v.22, p.3-8, 2009.

BALLESTER-COSTA, C.; SENDRA, E.; FERNANDEZ-LOPEZ, J.; PEREZ-ALVAREZ, J.A.; VIUDA-MARTOS, M. Chemical composition and in vitro antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth. *Ind. Crop. Prod*, v.50, p.304-311, 2013.

BARA, M.T.F.; RIBEIRO, P.A.M.; ARANTES, M.C.B.; AMORIM, L.L.S.S.; PAULA, J.R. Determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais. *Rev. Bras. Farmacog.*, v.16, p.211-215, 2006.

BARBOSA, L.N.; PROBST, I.D.A.S.; ANDRADE, B.F.; ALVES, F.C.; ALBANO, M.; DA CUNHA, M.D.E.L.; DOYAMA, J.T.; RALL, V.L.;

FERNANDES JÚNIOR, A. In vitro antibacterial and chemical properties of essential oils including native plants from Brazil against pathogenic and resistant bacteria. *J. Oleo Sci*, v.64, p.289-98, 2015.

BARRAU, K.; BOULAMERY, A.; IMBERT, G.; CASALTA, J.P.; HABIB, G.; MESSANA, T.; BONNET, J.L.; RUBINSTEIN, E.; RAOULT, D. Causative organisms of infective endocarditis according to host status. *Clinical. Clin. Microb. Infect*, v.10, p.302-308, 2004.

BASAPPA, G.; KUMAR, V.; SAROJINI, B.K.; POORNIMA D.V.; GAJULA, H.; SANNABOMMAJI, T.K.; RAJASHEKAR J. Chemical composition, biological properties of *Anisomeles indica* Kuntze essential oil. *Ind. Crop. Prod.*, v.77, p.89-96, 2015.

BASSOLÉ, I.H.N.; LAMIEN-MEDA, A.; BAYALA, B.; TIROGO, S.; FRANZ, C.; NOVAK, J.; NEBIÉ, R.C.; DICKO, M.H. Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. *Molecules*, v.15, p.7825-7839, 2010.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.45, p.493-496, 1966.

BAYDAR, H.; SAGDIC, O.; OZKAN, G.O.;KARADOGAN T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, v.15, p.169-172, 2004.

BECKER, M.R.; PASTER, B.J.; LEYS, E.J.; MOESCHBERGER, M.L.; KENYON, S.G.; GALVIN, J.L.; BOCHES, S.K.; DEWHIRST, F.E.; GRIFFEN, A.L. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J. Clin. Microbiol.*, v.40, p.1001-1009, 2002.

BENFATTI, C.S.; MAGINA, M.D.A.; CORDOVA, S.M. DE; CORDOVA, C.M.M. DE; GUEDES, A. Atividade antibacteriana in vitro de extratos brutos de espécies de *Eugenia* sp. frente a cepas de mollicutes. *Rev. Pan-Amaz. Saude*, v.1, p.33-39, 2010.

BENSO, B.; ROSALEN, P.L.; ALENCAR, S.M.; MURATA, R.M. *Malva sylvestris* inhibits inflammatory response in oral human cells an in vitro infection model. *PLoS ONE*, v.10, p.0140331, 2015.

BI, S.F.; ZHU, G.Q.; WU, J.; LI, Z.K.; LV, Y.Z.; FANG, L. Chemical composition and antioxidant activities of the essential oil from *Nandina domestica* fruits. *Nat. Prod. Res.*, v.30, p.362-365, 2016.

BIESBROCK, A.R.; WALTERS, P.A.; BARTIZEK, R.D. The relative effectiveness of six powered toothbrushes for dental plaque removal. *J. Clin. Dent.*, v.8, p.198-202, 2002.

BOURGEOIS-NICOLAOS, N.; LUCET, J.C.; DAUBIÉ, C.; BENCHABA, F.; RAJGURU, M.; RUIMY, R.; ANDREMONT, A.; ARMAND-LEFÈVRE, L. Maternal vaginal colonisation by *Staphylococcus aureus* and newborn acquisition at delivery. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.*, v.24, p.488-491, 2010.

BOWENAND, W.H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans* derived glucosyl transferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.*, v.45, p.69-86, 2011.

BRADSHAW, D.J.; MARSH, P.D.; WATSON, G.K.; ALLISON, C. Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral communities during aeration. *Infect. Immun.*, v.66, p.4729-4732, 1998.

BUDRI, P.E.; SILVA, N.C.; BONSAGLIA, E.C.; FERNANDES JÚNIOR, A.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P.; DOYAMA, J.T.; GONÇALVES, J.L.; SANTOS, M.V.; FITZGERALD-HUGHES, D.; RALL, V.L. Effect of essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* and their major components on biofilm production in *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with mastitis. *J. Dairy Sci.*, v.98, p.5899-5904, 2015.

BUENO-SILVA, B.; KOO, H.; FALSETTA, M.L.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Effect of neovestitol-vestitol containing Brazilian red propolis on accumulation of biofilm in vitro and development of dental caries in vivo. *Biofouling*, v.29, p.1233-1242, 2013.

BUKOVSKA, A.; CIKOS, S.; JUHAS, S.; ILKOVA, G.; REHAK, P.; KOPPEL, J. Effects of a combination of thyme and oregano essential oils on TNBS-induced colitis in mice. *Mediators Inflamm.* Id 23296, 2007.

BUKVIČKI D.; STOJKOVIĆ, D.; SOKOVIĆ, M.; VANNINI, L.; MONTANARI, C.; PEJIN, B.; SAVIĆ, A.; VELJIĆ, M.; GRUJIĆ, S.; MARIN, P.D. *Satureja horvatii* essential oil: in vitro antimicrobial and antiradical properties and in situ control of *Listeria monocytogenes* in pork meat. *Meat Sci.*, v.96, p.1355-1360, 2014.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *Int. J. Food Microbiol.*, v.94, p.223-253, 2004.

CABRAL, C.; POÇAS, J.; GONÇALVES, M.J.; CAVALEIRO, C.; CRUZ, M.T.; SALGUEIRO, L. *Ridolfia segetum* (L.) Moris (Apiaceae) from Portugal: A source of safe antioxidant and anti-inflammatory essential oil. *Ind. Crop. Prod.*, v.65, p.56-61, 2015.

CALLAWAY, T.R.; CARROLL, J.A.; ARTHINGTON, J.D.; EDRINGTON, T.S.; ROSSMAN, M.L.; CARR, M.A.; KRUEGER, N.A.; RICKE, S.C.; CRANDALL, P.; NISBET, D.J. *E. coli* O157:H7 populations in ruminants can be reduced by orange peel product feeding. *J. Food Protect.*, v.74, p.1917-1921, 2011.

CANETTIERI, A.C.V.; KRETCHETOFF, F.Y.; ITO, C.Y.K.; MOREIRA, D.; FUJARRA, F.J.C.; UNTERKIRCHER, C.S. Production of monoclonal antibodies against *Streptococcus mutans* antigens. *Braz. Oral Res.*, v.20, p.297-302, 2006.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin. Microb. Rev.*, v.19, p.50-62, 2006.

CARVALHO, A.C.B.; NUNES, D.S.G.; BARATELLI, T.G.; SHUQAIR, N.S.M.S.A.Q.; NETTO, E.M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. *T&C Amazônia*, v.5, p.26-32, 2007.

CARVALHO, C.M.; MACEDO-COSTA, M.R.; PEREIRA, M.S.V.; HIGINO, J.S.; CARVALHO, L.F.P.C.; COSTA, L.J. Efeito antimicrobiano in vitro do extrato de jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg.) sobre *Streptococcus* da cavidade oral. *Rev. Bras. Plantas Med.*, v.11, p.79-83, 2009.

CARVALHO, R.J.; SOUZA, G.T.; HONÓRIO, V.G.; SOUSA, J.P.; CONCEIÇÃO, M.L.; MAGANANI, M.; SOUZA, E.L. Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. *Food Microbiol.*, v.52, p.59-65, 2015.

CHALHOUB, E.; EMAMI, E.; FREIJE, M.; KANDELMAN, D.; CAMPESE, M.; ST-GEORGES, A.; VOYER, R.; ROMPRE, P.; BARBEAU, J.; LEDUC, A.; DURAND, R. Effectiveness of an alcohol-free essential oil-containing mouthwash in institutionalised elders receiving long-term care: a feasibility study. *Gerodontology*, v.33, p.69-78, 2016.

CHANG, L.; JIA, S.; FU, Y.; ZHOU, T.; CAO, J.; HE, Q.; YANG, B.; LI, X.; SUN, C.; SU, D.; ZHU, H.; CHEN, K. Ougan (*Citrus reticulata* cv. *Suavissima*) flavedo extract suppresses cancer motility by interfering with epithelial-to-mesenchymal transition in SKOV3 cells. *Chin. Med.*, v.27, p.10-14, 2015.

CHEN, Y.; WONG, R.W.K.; MCGRATH, C.; HAGG, U.; SENEVIRATNE, C.J. Natural compounds containing mouthrinses in the management of dental plaque and gingivitis: a systematic review. *Clin. Oral Invest.*, v.18, p.1-16, 2014.

CHHOUR, K.L.; NADKARNI, M.A.; BYUN, R.; MARTIN, F.E.; JACQUES, N.A.; HUNTER N. Molecular analysis of microbial diversity, in advanced caries. *J. Clin. Microbiol.*, v.43, p.843-849, 2005.

CHOI, B.K.; KIM, K.Y.; YOO, Y.J.; OH, S.J.; CHOI, J.H.; KIM, C.Y. In vitro antimicrobial activity of a chitoooligosaccharide mixture against *Actinobacillus Actinomyces entemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, v.18, p.553-557, 2001.

CHUNG, J.Y.; CHOO, J.H.; LEE, M.H.; HWANG, J.K. Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragrans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. *Phytomedicine*, v.13, p.261-266, 2006.

CIANDRINI, E.; CAMPANA, R.; FEDERICI, S. In vitro activity of Carvacrol against titanium-adherent oral biofilms and planktonic cultures. *Clin. Oral Invest.*, v.18, p.2001-2013, 2014.

CLAYDON, N.C. Current concepts in toothbrushing and interdental cleaning. *Periodontol 2000*, v.48, p.10-22, 2008.

CORTELLI, S.C.; CORTELLI, J.R.; SHANG, H.; COSTA, R.; CHARLES, C.A. Gingival health benefits of essential-oil and cetylpyridinium chloride mouthrinses: A 6-month randomized clinical study. *Am. J. Dent*, v.27, p.119-126, 2014.

COSTA, A.C.; SANTOS, B.H.C.; SANTOS-FILHO, L.; LIMA, E.O. Antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) against bacterial multiresistant strains isolated from nosocomial patients. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.19, p.236-241, 2009.

COX, S.D.; MANN, C.M.; MARKHAM, J.L. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Microb.*, v.91, p.492-497, 2001.

CURY, J.A.; TENUTA, L.M.A.; RIBEIRO, C.C.C.; PAES-LEME, A.F. The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. *Braz. Dent. J.*, v.5, p.167-174, 2004.

DAL POZZO, M.J.V.; SANTURIO, D.F.; ROSSATTO, L.; SOARES, I.H.; ALVES, S.H.; COSTA, M.M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp isolados de mastite caprina. *Cienc. Rural*, v.41, p.667-672, 2011.

DAVID, B.; WOLFENDER, J.L.; DIAS, D.A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochem. Rev.*, v.14, p.299-315, 2015.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov*, v.2, p.114-122, 2003.

DAVIES, R.M. Toothpaste in the control of plaque/gingivitis and periodontitis. *Periodontology 2000*, v.48, p.23-30, 2008.

DELAMARE, A.P.; PISTORELLO, I.T.M.; ARTICO, L.; SERAFINI, L.A.; ECHEVERRIGARAY, S. Antibacterial activity of essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chem.*, v.100, p.603-608, 2007.

DE LISI, A.; TEDONE, L.; MONTESANO, V.; SARLI, G.; NEGRO, D. Chemical characterisation of *Thymus* populations belonging from Southern Italy. *Food Chem.*, v.125, p.1284-1286, 2011

DE VOS, P. European material medica in historical texts: Longevity of a tradition and implications for future use. *J. Ethnopharmacol.*, v.132, p.28-47, 2010.

DELEO, F.R.; OTTO, M.; KREISWIRTH, B.N.; CHAMBERS, H.F. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, v.375, p.1557-1568, 2010.

DIAZ, M.A.N.; TAGAMI, M.G.; LORSCHHEIDE, P.M. Atividade microbiana de óleos essenciais e extratos de própolis sobre bactérias cariogênicas, *Rev. Ciênc. Farm. Básica*, v.28, p.93-97, 2007.

DONATO, R.; SANTOMAURO, F.; BILIA, A.R.; FLAMINI, G.; SACCO, C. Antibacterial activity of Tuscan *Artemisia annua* essential oil and its major components against some foodborne pathogens. *LWT - Food Sci. Technol.*, v.64, 1251-1254, 2015.

DUARTE, A.; LUÍS, Â.; OLEASTRO, M.; DOMINGUES, F.C. Antioxidant properties of coriander essential oil and linalool and their potential to control *Campylobacter* spp. *Food Control*, v.61, p.115-122, 2016.

DUNN, L.L.; DAVIDSON, P.M.; CRITZER, F.J. Antimicrobial efficacy of an array essential oils against lactic acid bacteria, *J. Food Sci.*, v.81, p.438-444, 2016.

FALCÃO, A.; TENUTA, LMA.; CURY, J.A. Fluoride gastrointestinal absorption from Na<sub>2</sub>FPO<sub>3</sub>/CaCO<sub>3</sub>- and NaF/SiO<sub>2</sub>-based toothpastes. *Caries Res.*, v.47, p.226-233, 2013.

FANI, M.M.; KOHANTEB, J.B. Inhibitory Activity of *Cinnamomum zeylanicum* and *Eucalyptus globulus* oils on *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida* species isolated from patients with oral infections. *Shiraz Univ. Dent. J.*, v.11, p.14-22, 2011.

FARRUGIA, C.; CASSARB, G.; VALDRAMIDISC, V.; CAMILLERIA, J. Effect of sterilization techniques prior to antimicrobial testing on physical properties of dental restorative materials, *J. Dent.*, v.43, p.703-714, 2015.

FEJERSKOV, O.; MANJI, F.; BAEUM, V. The nature and mechanisms of dental fluorosis in man. *J. Dent. Res.*, v.8, p.15-31, 1990.

FENIMAN, C.M.; RALL, V.L.; DOYAMA, J.T.; JÚNIOR, A.F. Cell enumeration and visualisation by transmission electron microscopy of *Lactobacillus rhamnosus* treated with cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* B.) essential oil. *Nat. Prod. Res.*, v.26, p.1721-1723, 2012.

FERREIRA, E.F.; VARGAS, A.M.; CASTILHO, L.S.; VELÁSQUEZ, L.N.; FANTINEL, L.M.; ABREU, M.H. Factors associated to endemic dental fluorosis in Brazilian rural communities. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v.7, p.3115-3128, 2010.

FILOCHE, S.K.; SOMA, K.; SISSONS, C.H. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate, *Oral Microbiol. Immun.*, v.20, p.221-225, 2005.

FINE, D.H.; MARKOWITZ, K.; FURGANG, D.; GOLDSMITH, D.; NITTEL-  
RICCI, D.; CHARLES, C.H. PENG, P.; LYNCH, M.C. Effect of rinsing with an essential oil- containing mouthrinse on subgingival periodontopathogens. *J. Periodontol.*, v.78, p.1935-1942, 2007.

FISCHMAN, S.L. Hare's teeth to fluorides, historical aspects of dentifrice use. *Clinical and Biological Aspects of Dentifrices*. New York, Oxford Medical Publications, p.1-7, 1992.

FRANÇA, W.F.A.; MARQUES, M.M.M.R.; LIRA, K.D.L.; HIGINO, M.E. Terapêutica com plantas medicinais nas doenças bucais: a percepção dos profissionais no programa de saúde da família do Recife. *Odontologia. Clín. Científ.*, v.6, p.233-237, 2007.

FREIRE, I.C.M.; PÉREZ, A.L.A.L.; CARDOSO, A.M.R.; MARIZ, B.A.L.A.; ALMEIDA, L.F.D.; CAVALCANTI, Y.W.; PADILHA, W.W.N. Atividade antibacteriana de óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*, *Rev. Bras. Pl. Med.*, v.16, p.372-377, 2014.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P.R.; MANDRELL, R.E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.*, v.65, p.1545-1560, 2002.

GAÍNZA, Y.A.; DOMINGUES, L.F.; PEREZA, O.P.; RABELO, M.D.; LÓPEZ, E.R.; CHAGAS, A.C.S. Anthelmintic activity in vitro of *Citrus sinensis* and *Melaleuca quinquenervia* essential oil from Cuba on *Haemonchus contortus*. *Ind. Crop. Prod.*, v.76, p.647-652, 2015.

GALINDO, L.A.; PULTRINI, A.M.; COSTA, M. Biological effects of *Ocimum gratissimum* L. are due to synergic action among multiple compounds present in essential oil. *J. Nat. Med.*, v.64, p.436-441, 2010.

GAO, M.; TEPLITSKI, M.; ROBINSON, J.B.; BAUER, W.D. Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. *Mol. Plant Microbe Interact.*, v.16, p.827-834, 2003.

GAYOSO, C.W.; LIMA, E.O.; TRAJANO, V.N.; PEREIRA, F.O.; SOUZA, E.L.; LIMA, I.O.; NAVARRO, D.F. Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to *Eugenia cariophyllata* essential oil and eugenol. *Fitoterapia*, v.76, p.247-249, 2005.

GEBRAN, M.P.; GEBERT, A.P. Controle químico e mecânico de placa bacteriana. *Tuiuti: Ciência e Cultura*, v.26, p.45-58, 2002.

GHABRAIE, M.; VU, K.D.; TATA, L.; SALMIERI, S.; LACROIX, M.L.W.T. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat - LWT - *Food Sci. Technol.*, v.66, p.332-339, 2016.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. *Química Nova*, v.30, p.374-381, 2007.

GOLD, O.G.; JORDAN, H.V.; VAN HOUTE, J.A. Selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.*, v.18, p.1357-1364, 1973.

GONÇALVES, G.M.S.; BOTTARO, M.; NILSON, A.C. Effect of the *Thymus vulgaris* essential oil on the growth of *Streptococcus mutans*. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v.32, p.375-380, 2011.

GREATTI, V.R.G.; NEVES, F.T.A.; CORAL, D.J.; WECKWERTH, P.H. Avaliação da atividade antibacteriana "in vitro" da aroeira (*Schinus Terebinthifolius*) e da canela (*Cinnamomum Zeylanicum*) frente a linhagens Gram positivas e Gram negativas. *Salusvita*, v.33, p.345-354, 2014.

GRIGOLEIT, H.G.; GRIGOLEIT, P. Peppermint oil in irritable bowel syndrome. *Phytomedicine*, v.12, p.601-006, 2005.

GRÖNROOS, L. Quantitative and qualitative characterization of *Streptococci mutans* in saliva and in the dentition [Dissertation]. Helsinki: Faculty of Medicine of the University of Helsinki, 2000.

GRUENWALD, J.; FREDER, J.; ARMBRUESTER, N. Cinnamon and health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v.50, p.822-834, 2010.

HAMMER, K.A.; DRY, L.; JOHNSON, M.; MICHALAK, E.M.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro. *Oral Microbiol. Immunol.*, v.18, p.389-392, 2003.

HARAGUCHI, H.; INOUE, J.; TAMURA, Y.; MIZUTANI, K. Inhibition of mitochondrial lipid peroxidation by bakuchiol, a meroterpene from *Psolalea corylifolia*. *Planta Med.*, v.66, p.569-571, 2000.

HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine*, v.16, p.997-1005, 2009.

HENDRY, E.R.; WORTHINGTON T.; CONWAY B.R.; LAMBERT P.A. 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. Antimicrob. Chemoth.*, v.64, p.1219-1225, 2009.

HERMAN, A.; TAMBOR, K.; HERMAN, A. Linalool affects the antimicrobial efficacy of essential oils, *Curr. Microbiol.*, v.72, p.165-172, 2016.

HERNANDEZ-OCHOA, L.; AGUIRRE-PRIETO, Y.B.; NEVAREZ-MOORILLON, G.V.; GUTIERREZ-MENDEZ, N.; SALAS-MUÑOZ, E. Use of essential oils and extracts from spices in meat protection. *J. Food Sci. Tech.-Mys.*, v.51, p.957-963, 2014.

HÖFERL, M.; BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L.; SCHMIDT, E., STOYANOVA, A., DENKOVA, Z.; SLAVCHEV, A.; GEISLER, M. Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. *J. Essent. Oil Res*, v.21, p.459-464, 2009.

HOLZAPFEL, W.H.; WOOD, B.J.B. *Lactic acid bacteria: Biodiversity and taxonomy*. New York, NY, USA: Wiley-Blackwell press, 2014.

HUDAIB, M.; SPERONI, E.; DI PIETRA, A.M.; CAVRINI, V. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *J. Pharmaceut. Biomed. An.*, v.29, p.691-700, 2002.

INOUE, F. DE A. Avaliação de atividades biológicas e estudo fitoquímico de extratos de flores de *Senna macranthera*. Dissertação de Mestrado em Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, 2014.

IRIE, K.; TOMOFUJI, T.; EKUNI, D.; ENDO, Y.; KASUYAMA, K.; AZUMA, T.; TAMAKI N.; YONEDA, T.; MORITA, M. Anti-ageing effects of dentifrices containing antioxidative, anti-inflammatory, and anti-bacterial agents (Tomarina W) on gingival collagen degradation in rats. *Arch. Oral Biol*, v.59, p.60-65, 2014.

JAISWAL, P.; KUMAR, P.; SINGH, V.K.; SINGH, D.K. Biological effects of *Myristica fragrans*. *Annu. Rev. Biomed. Sci.*, v.11, p.21-29, 2009.

JAKUBOVICS, N.S. Talk of the town: interspecies communication in oral biofilms. *Mol. Oral Microbiol.*, v.25, p.4-14, 2010.

JENKINSON, H.F.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Biofilms adhere to stay. *Trend. Microbiol.*, v.9, p.9-10, 2001.

JIMÉNEZ-FARFÁN, M.D.; HERNÁNDEZ-GUERRERO, J.C.; JUÁREZ-LÓPEZ, L.A.; JACINTO-ALEMÁN, L.F.; FUENTE-HERNÁNDEZ, J. Fluoride consumption and its impact on oral health. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v.8, p.148-160, 2011.

JOVANKA, L.; ČABARKAPA, I.; TODOROVIĆ, G.; PAVKOV, S.; SREDANOVIĆ, S.; COGHILL-GALONJA, T.; KOSTADINOVIĆ, L. In vitro antibacterial activity of essential oils from plant family Lamiaceae. *Rom. Biotech. Lett.*, v.16, p.6034-6041, 2011.

- JYOTI, S.; SHASHIKIRAN, N.D.; REDDY, V.V.S. Effect of Lactoperoxidase system containing toothpaste on cariogenic bacteria in children with early childhood caries. *J. Clin. Pediatr. Dent.*, v.33, p.299-304, 2009.
- KAMATOU, GUY P.P.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A.M.; LAWRENCE, B.M. Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties. *Phytochemistry*, v.96, p.15-25, 2013.
- KATSURA, H.; TSUKIYAMA, R.I.; SUZUKI, A.; KOBAYASHI, M. In vitro antimicrobial activities of bakuchiol against oral microorganisms. *Antimicrob. Agent Chemoth.*, v.45, p.3009-3013, 2001.
- KHALED, S., SAKOUHI, F., HERCHI, W., KHOUJA, M.L., BOUKHCHINA, S. Chemical composition and antibacterial activities of seven Eucalyptus species essential oils leaves. *Biol. Res.*, v.48, p.48-47, 2015.
- KHAN, M., ZILL-E-HUMA, O. DANGLES, A. comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols, *J. Food Comp. Analysis*, v.33, p.085-104, 2014.
- KLEIN, R.C.; FABRES-KEIN, M.H.; OLIVEIRA, L.L.; FEIO, R.N.; MALOUIN, F.; RIBON, A.O.B. A C-Type Lectin from Bothrops jararacussu Venom Disrupts Staphylococcal Biofilms. *PLoS ONE*, v.10, p.0120514, 2015.
- KOLENBRANDER, P.E. Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque. *Annu. Rev. Microbiol*, v.42, p.627-656, 1988.
- KONTO-GHIORGHI, Y.; MAIREY, E.; MALLET, A.; DUMÉNIL, G.; CALIOT, E.; TRIEU-CUOT, P.; DRAMSI, S. Dual Role for Pilus in Adherence to Epithelial Cells and Biofilm Formation in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathog.*, v.5, p.1000422, 2009
- LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.; NYCHAS, G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, v.91, p.453-462, 2001.
- LEDDER, R.G.; SREENIVASAN, P.K.; DEVIZIO, W.; MCBAIN, A.J. Evaluation of the specificity and effectiveness of selected, oral hygiene actives in salivary biofilm microcosms. *J. Med. Microbiol.*, v.59, p.1462-1468, 2010.
- LEITES, A.C.B.R.; PINTO, M.B.; SOUSA, E.R.S. Aspectos microbiológicos da cárie dental. *Salusvita*, v.25, p.239-252, 2006.

LIMA, I.O.; OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; FARIAS, N.M.P.; SOUZA, E.L. Antifungal activity from essential oils on *Candida* species. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.16, p.97-201, 2006.

LIMA JÚNIOR, J.F.; DIMENSTEIN, M.A. Fitoterapia na Saúde Pública em Natal/RN: visão do odontólogo. *Saúde Ver.*, v.8, p.37-44, 2006.

LIMA, M.P.; ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; SILVA, T.M.D. FERNANDES, C.S. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Acta Amazon.*, v.35, p.363-366, 2005.

LINS, R.; VASCONCELOS, F.H.P.; LEITE, R.B.; COELHO-SOARES, R.S.; BARBOSA, D.N. Avaliação clínica de bochechos com extratos de Aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e Camomila (*Matricaria recutita* L.) sobre a placa bacteriana e a gengivite. *Rev. Bras. Plantas Med.*, v.15, p.112-120, 2013.

LOBO, P.L.; FONTELES, C.S.; MARQUES, L.A.; JAMACARU, F.V.; FONSECA, S.G.; DE CARVALHO, C.B.; DE MORAES, M.E. The efficacy of three formulations of *Lippia sidoides* Cham. essential oil in the reduction of salivary *Streptococcus mutans* in children with caries: A randomized, double-blind, controlled study. *Phytomedicine*, v.21, p.1043-1047, 2014.

LOPEZ, P.; SANCHEZ, C.; BATLLE, R.; NERÍN, C. Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. *J. Agric. Food Chem.*, v.55, p.4348-4356, 2007.

LYNCH, A.S.; ROBERTSON, G.T. Bacterial and fungal biofilm infections. *Rev. Med.*, v.59, p.415-428, 2008.

MAIDA, I.; NOSTRO, A.L.; PESAVENTO, G.; BARNABEI, M.; CALONICO, C.; PERRIN, E.; CHIellini, C.; FONDI M.; MENGONI, A.; MAGGINI, V.; VANNACCI, A.; GALLO, E.; BILIA, A.R.; FLAMINI, G.; GORI, L.; FIRENZUOLI, F., FANI, R. Exploring the Anti-Burkholderia cepacia complex activity of essential oils: A preliminary analysis, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, v.10, 573518, 2014.

MAKSIMOVIC, Z.; STOJANOVIC, D.; SOSTARIC, I.; DAJIC, Z.; RISTIC, M. Composition and radical-scavenging activity of *Thymus glabrescens* Willd. (Lamiaceae) essential oil. *J. Sci. Food Agric.*, v.88, p.2036-2041, 2008.

MANNERS G. Review of citrus limonoids: analysis, bioactivity and biomedical prospects, *J. Agric. Food Chem.*, v.55, p.8285-8294, 2007.

MARINHO, R.V.S.; ARAÚJO, A.C.S. O uso dos enxaguatórios bucais sobre a gengivite e o biofilme dental, *Int. J. Dent.*, v.6, p.124-131, 2007.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *Int. J. Food Microbiol.*, v.67, p.187-195, 2001.

MARSH, P.; MARTIN, M. Oral microbiology 3.ed. London, United Kingdom: Chapman & Hall, 1992.

MARSH, P.D. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style, *J. Clin. Periodontol.*, v.32, p.7-15, 2005.

MARSH, P.D.; MOTER, A.; DEVINE, D.A. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontology 2010*, v.53, p.16-35, 2011.

MASCARENHAS, A.K. Risk factors for dental fluorosis: A review of the recent literature. *Pediatr. Dent.*, v.22, p.269-277, 2000.

MATAN, N.; RIMKEEREE, H.; MAWSON, A.J.; CHOMPREEEDA, P.; HARUTHAITHANASAN, V.; PARKER M. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, v.107, p.180-185, 2006.

MC KAY, D.L.; BLUMBERG, J.B.A. Review of the bioactivity and potencial health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother. Res.*, v.20, p.519-530, 2006.

MEISTER, A.; BERNHARD, G.; CHRISOFFEL, V.; BUSCHAUER, A. Antispasmodic activity of *Thymus vulgaris* extract on isolated guinea-pig trachea: discrimination between drug and ethanol effects. *Planta Med.*, v.65, p.512-516, 1999.

MELZER, M.; WELCH, C. Thirty-day mortality in UK patients with community-onset and hospital-acquired methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *J. Hosp. Infect.*, v.84, p.143-150, 2013.

MENEZES, V.A.; CAVALCANTI, G.; MORA, C.; GARCIA, A.F.G.; LEAL, R.B. Pediatric medicines and their relationship to dental caries. *Braz. J. Pharm. Sci.*, v.46, p.157-164, 2010.

MEYER, A.C.A.; TERA, T.M.; ETO, Y. Manual odontológico de formulações manipuladas. Livraria Santos Editora Ltda., São Paulo, p.6-8, 2007.

MEYER, D.H.; FIVES-TAYLOR, P.M. Oral pathogens: from dental plaque to cardiac disease. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.1, p.88-95, 1998.

MILLER, A.B.; CATES, R.G.; LAWRENCE, M.; SORIA, J.A.; ESPINOZA, L.V.; MARTINEZ, J.V.; ARBIZÚ, D.A. The antibacterial and antifungal activity of essential oils extracted from Guatemalan medicinal plants, *Pharm. Biol.*, v.53, p.548-554, 2015.

MOSCHONAS, G.; GEORNARAS, I.; STOPFORTH, J.D.; WOERNER, D.R.; BELK, K.E.; SMITH, G.C.; SOFOS, J.N. Effect of product dimensions and surface browning method on salmonella contamination in frozen, surface-browned, breaded chicken products treated with antimicrobials. *J. Food Sci.*, v.80, p.2815-2821, 2015.

NASCIMENTO, H.A.R.; FERREIRA, J.M.S.; GRANVILLE-GARCIA, A.F.; COSTA, E.M.M.B.; CAVALCANTE, A.L.A.; SAMPAIO, F.C. Estimation of toothpaste fluoride intake in preschool children, *Braz. Dent. J.*, v.24, p.142-146, 2013.

NEUMEGEN, R.A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R.; CHISTI, Y. Toxicities of triclosan, phenol, and copper sulfate in activated sludge. *Environ. Toxicol.*, v.20, p.160-164, 2005.

NOSTRO, A.; SUDANO, R.A.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, M.A.; PIZZIMENTI, F.C. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Med. Microbiol.*, v.56, p.519-523, 2007.

NOVAIS, S.M.A.; BATALHA, R.P.; GRINFELD, S.; FORTES, T.M.; PEREIRA, M.A.S. Relação doença cárie-açúcar: prevalência em crianças. *Pesq Bras. Odontoped Clin. Integr.*, v.4, p.199-203, 2004.

NOVÁK, I.; ZÁMBORI-NÉMETH, É.; HORVÁTH, H.; SEREGÉLY, Z.S.; KAFFKA, K. Study of essential oil components in different *Origanum* species by gc and sensory analysis. *Ac. Aliment.*, v.32, p.141-150, 2003.

OHARA-NEMOTO, Y.; HARAGA, H.; KIMURA, S.; NEMOTO, T.K. Occurrence of staphylococci in the oral cavities of healthy adults and nasal oral trafficking of the bacteria. *J. Med. Microbiol.*, v.57, p.95-99, 2008.

OKPALUGO, J.; IBRAHIM, K.; INYANG, U.S. Toothpaste formulation efficacy in reducing oral flora. *Trop. J. Pharm. Res.*, v.8, p.71-77, 2009.

OLIVEIRA, J.L.T.M.; DINIZ, M.F.M.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L.; TRAJANO, V.N.; SANTOS, B.H.C. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. essential oils in inhibiting the growth of bacterial

strains isolated from the patients with conjunctivitis. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v.52, p.45-50, 2009.

OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; VIEIRA, W.L.; FREIRE, K.R.L.; TRAJANO, V.N.; LIMA, I.O.; SOUZA, E.L.; TOLEDO, M.S.; SILVA-FILHO, R.N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Ver. Bras. Farmacogn.*, v.16, p.77-82, 2006.

OLIVEIRA, S.M.M.; LORSCHIEDER, J.A.; NOGUEIRA, M.A. Avaliação da ação in vitro de gel dentifrício contendo óleos essenciais sobre bactérias cariogênicas. *Latin Am. J. Pharm.*, v.27, p.266-269, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines – Report of a WHO global survey. Genebra, 156p. 2005.

OTTO, M. Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.64, p.143-162, 2010.

OTTO, M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity *Annu. Rev. Med.*, v.64, p.175-188, 2013.

PALANIAPPAN, K.; HOLLEY, R.A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, v.140, p.164-168, 2010.

PARADELLA, T.C.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.O.C. *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. *Rev. Odontol. UNESP*, v.36, p.163-168, 2007.

PARASKEVAS, S. Randomized controlled clinical trials on agents used for chemical plaque control. *Int. J. Dent. Hyg.*, v.3, p.162-178, 2005.

PASSARIELLO, C.; SANNINO, G.; PETTI, S.; GIGOLA, P. Intensity and duration of in-vitro antibacterial activity of different adhesives used in orthodontics. *Eur. J. Oral Sci.*, v.122, p.154-160, 2014.

PATEL, R. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin. Orthop. Relat Res.*, v.437, p.41-7, 2005.

PATILA, J.R.; JAYAPRAKASHA, G.K.; MURTHYA, C.; CHETTIB, M.B.; PATILA, B.S. Characterization of *Citrus aurantifolia* bioactive compounds and

their inhibition of human pancreatic cancer cells through apoptosis. *Microchem. J.*, v.94, p.108-117, 2010.

PEREIRA, A.A.; CARDOSO, M.G.; ABREU, L.R.; MORAIS, A.R.; GUIMARÃES, L.G.L.; SALGADO, A.P.S.P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Cienc. Agrotec.*, v.32, p.887-893, 2008.

PEREIRA, C.V. Ação de amostras de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* sobre diferentes carboidratos com ênfase dentária - estudo in vitro. *Rev. Faculdade de Odont.*, v.4, p.33-39, 1999.

PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V.; HIGINO, J.S.; SAMPAIO, F.C.; ALVES, P.M.; ARAÚJO, C.R.F. Estudos com o extrato da *Punica granatum* Linn. (romã): efeito antimicrobiano in vitro e avaliação clínica de um dentifrício sobre microrganismos do biofilme dental. *Rev. Odont. Ciênc.*, v.20, p.262-269, 2005.

PERES, L.E.P. *Metabolismo Secundário*. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP, p.1-10, 2004

PESAVENTO, G.; CALONICO, C.; BILIA, A.R.; BARNABEI M.; CALESINI, F.; ADDONA, R.; MENCARELLI, L.; CARMAGNINIA, L.; DI MARTINO, M.C.; LO NOSTRO, A. Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. *Food Control*, v.54, p.188-199, 2015.

PETERSEN, P.E.; BOURGEOIS, D.; OGAWA, H.; ESTUPINAN-DAY, S.; NDIAYE, C. The global burden of oral disease and risks to oral health. *Bull. World Health Organi.*, v.83, p.661-669, 2005.

PETERSON, S.N.; SNESRUD, E.; SCHORK, N.J.; BRETZ, W.A. Dental caries pathogenicity: a genomic and metagenomic perspective *Int. Dent. J.*, v.61, p.11-22, 2011.

PIHLSTROM, B.L.; MICHALOWICZ, B.S.; JOHNSON, N.W. Periodontal diseases. *Lancet*, v.19, p.1809-1820, 2005.

PION, F.L.B.; ARAÚJO, M.W.B.; FERES, M.; CORTELLI, S.C. Condição periodontal de um subgrupo populacional do município de Guarulhos, SP. *Rev. Bras. Epidemiol.*, v.9, p.335-345, 2006.

PITTS, B.; HAMILTON, M.A.; ZELVER, N.; STEWART P.S. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *J. Microb. Method.*, v.54, p.269-276, 2003.

PORTE, A.; GODOY, R.L.O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. Bol. Centro Pesqui. Process. Aliment., v.19, p.193-210, 2001.

PORTENIER, I.; WALTIMO, T.M.T.; HAAPASALO, M. *Enterococcus faecalis* - the root canal survivor and 'star' in post-treatment disease. Endod. Topics, v.6, p.135-159, 2003.

POZZATTI, P; LORETO, E.S.; LOPES, P.G.M; ATHAYDE, M.L; SANTURIO, J.M; ALVES, S.H. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. Mycoses, v.53, p.12-15, 2009.

PROBST, I.S.; SFORCIN, J.M.; RALL, V.L.M.; FERNANDES, A.A.H.; FERNANDES JÚNIOR, A. Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural products. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis., v.17, p.159-167, 2011.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. Fitoterapia, v.82, p.513-523, 2011.

QIU, Q.; ZHANG, G.; SUN, X.; LIU, X. Study on chemical constituents of the essential oil from *Myristica fragrans* Houtt. by supercritical fluid extraction and steam distillation. J. Chin. Med. Mater., v.27, p.823-826, 2004.

RADÜNZ, L.L.; MELO, E.C.; BERBERT, P.A.; BARBOSA, L.C.A.; SANTOS, R.H.S.; ROCHA, R.P. Influência da temperatura do ar de secagem na quantidade do óleo essencial extraído de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel). Rev. Bras. Armaz., v.28, p.41-45, 2003.

RAMS, T.E.; DEGENER, J.E.; VAN WINKELHOFF, A.J. Prevalence of beta-lactamase-producing bacteria in human periodontitis. J. Periodont. Res., v.48, p.493-499, 2013.

RAN, S.; LIU, B.; JIANG, W.; SUN, Z.; LIANG, J. Transcriptome analysis of *Enterococcus faecalis* in response to alkaline stress. Front. Microbiol., v.6, p.795, 2015.

REIS, J.; MELO, P. A cárie dentária, uma doença infecciosa. Rev. Port. Saúde Pública, v.21, p.35-40, 2003.

RETTA, D.; DELLACASSA, E.; VILLAMIL, J.; SUÁREZ, S.A.; BANDONI, A.L. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. Ind. Crop. Prod, v.38, p.27-38, 2012.

RHAYOUR, K.; BOUCHIKHI, T.; TANTAOUI, A.; SENDIDE, K.; REMMAL, A. The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Essent. Oils Res*, v.15, p.286-292, 2003.

RIBEIRO, A.Q.; LEITE, J.P.V.; DANTAS-BARROS, A.M. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.15, p.65-70, 2005.

RIBEIRO, L.G.; HASHIZUME, L.N.; MALTZ, M. The effect of different formulations of chlorhexidine in reducing levels of mutans streptococci in the oral cavity: a systematic review of the literature. *J. Dent.*, v.35, p.359-370, 2007.

RICOMINI FILHO, A.P.; TENUTA, L.M.A.; FERNANDES, F.S.F.; CALVO S.C.K.; CURY, J.A. Fluoride concentration in the top-selling Brazilian toothpastes purchased at different regions. *Braz. Dent. J.*, v.23, p.45-48, 2012.

RODRIGUES, M.L.; LIRA, R.K. Perfil fitoquímico e biológico do extrato hidroalcoólico dos rizomas do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). *Rev. Saúde Biol*, v.8, p.44-52, 2013.

ROSAN, B.; LAMONT, R.J. Dental plaque formation, *Microbes Infect.*, v.2, p.1599-1607, 2000.

RUBIOLO, P.; GORBINI, B.; LIBERTO, S.E.; CORDERO, C.; BICCHI, C. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. A review. *Flavour Frag. J.*, v.25, p.282-290, 2010.

RUMJANEK, N.G.; FONSECA, M.C.C.; XAVIER, G.R. Quorum sensing em sistemas agrícolas. *Biotec. Cienc. Desenvol.*, v.33, p.35-50, 2004.

SALGADO, A.D.Y.; MAIA, J.L.; PEREIRA, S.L.S., LEMOS, T.L.G.; MOTA, O.M.L.; Antiplaque and antigingivitis effects of a gel containing *Punica granatum* linn extract: a doubleblind clinical study in humans. *J. Appl. Oral Sci.*, v.14, p.162-166, 2006.

SANTAMARIA, M. JR.; PETERMANN, K.D.; VEDOVELLO, S.A.; DEGAN, V.; LUCATO, A.; FRANZINI, C.M. Antimicrobial effect of *Melaleuca alternifolia* dental gel in orthodontic patients. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.*, v.145, p.198-202, 2014.

SANTOS, A. Evidence-based control of plaque and gingivitis. *J. Clin. Periodontol*, v.30, p.13-16, 2003.

SANTOS, R.; PEREIRA, D.F.A.; TEODORO, G.R.; DEL CIAMPO, J.O.; OGASAWARA, M.S.; CANETTIERI, A.C.V.; KHOURI, S.; SALVADOR, M.J. Óleo essencial de *Thymus vulgaris*: elaboração de enxaguatório bucal e avaliação do efeito in vitro na formação da placa bacteriana. *Lat. Am. J. Pharm.*, v.29, p.941-947, 2010.

SAS Institute. 1997. User`s guide: statistics. SAS Institute Cary, NC, USA.

SATOKARI, R.M.; VAUGHAN, E.E.; SMIDT, H.; SAARELA, M.; MATTO, J.; DE VOS, W.M. Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. *Syst. Appl. Microbiol.*, v.26, p.572-584, 2003.

SCHEIE, A.A.; PETERSEN, F.C. Antimicrobials in caries control. In: FEJERSKOV, O.; KIDD, E. *Dental Caries. The disease and its clinical management*, 2nd edn. Oxford: Blackwell Munksgaard, p. 265-277, 2008.

SCHILLACI, D.; NAPOLI, E.M.; CUSIMANO, M.G.; VITALE, M.; RUBERTO, A. *Origanum vulgare* subsp *Hirtum* essential oil prevented biofilm formation and showed antibacterial activity against planktonic and sessile bacterial cells. *J. Food Prot.*, v.76, p.1747-1752, 2013.

SERTKAYA, E.; KAYA, K., SOYLU, S. Acaricidal activities of the essential oils from several medicinal plants against the carmine spider mite (*Tetranychus cinnabarinus* Boisd.) (Acarina: Tetranychidae). *Ind. Crop. Prod.*, v.31, p.107-112, 2010.

SHAFAGHAT, A. Antibacterial activity and GC/MS analysis of the essential oils from flower, leaf and stem of *Origanum vulgare* ssp. *viride* growing wild in north-west Iran. *Nat. Prod. Commun.*, v.6, p.1351-1352, 2011.

SHAYEGH, S.; RASOOLI, I.; TAGHIZADEH, M.; ASTANEH, S.D. Phytotherapeutic inhibition of supragingival dental plaque. *Nat. Prod. Res.*, v.22, p.428-39, 2008.

SIENKIEWICZ, M.; LYSAKOWSKA, M.; CIECWIERZ, J.; DENYS, P.; KOWALCZYK, E. Antibacterial activity of thyme and lavender essential oils. *Med. Chem.*, v.7, p.674-689, 2011.

SIGNORETTO, A.M.; BERTONCELLI, A.; BURLACCHINI, G.; TESSAROLO, F.; CAOLA, L.; PEZZATI, E.; ZAURA, E.; PAPETTI, A.; LINGSTROM, P.; PRATTEN, J.; SPRATT, D.A.; WILSON, M.; CANEPARI, P. Effects of mushroom and chicory extracts on the physiology and shape of *Prevotella inter006Dedia*, a periodonto pathogenic bacterium. *J. Biomed. Biotechnol.*, 635348, p.1-8, 2011.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S.M.; DUARTE, V.G.; MACHADO, M.I.L.; MATOS, F.J.A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *J. Ethnopharmacol.*, v.89, p.277-283, 2003.

SILVA, F.; DOMINGUES F.C. Antimicrobial activity of coriander oil and its effectiveness as food preservative. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v.1, 2015.

SILVEIRA, S.M.; CUNHA JÚNIOR, A.; SCHEUERMANN, G.NEUDÍ.; SECCHI, F.L.; VIEIRA, C.R.W. Composição química e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas selecionadas cultivadas no Sul do Brasil contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes de alimentos. *Cienc. Rural*, v.42, p.1300-1306, 2012.

SILVESTRI, J.D.F.; PAROUL, N.; CZYEWski, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN, R.L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). *Rev. Ceres*, v.57, p.589-594, 2010.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 1102 p., 2004.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento* 6a ed, UFRGS: Porto Alegre, 2007.

SINGH, G.; KAPOOR, I.P.; SINGH, P.; HELUANI, C.S.; LAMPASONA, M.P.; CATALAN, C.A. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food Chem. Toxicol.*, v.46, p.3295-3302, 2008.

SMITH, A.J.; ROBERTSON, D.; TANG, M.K.; JACKSON, M.S.; MACKENZIE, D.; BAGG, J. *Staphylococcus aureus* in the oral cavity: a three-year retrospective analysis of clinical laboratory data. *Braz. Dent. J.*, v.195, p.701-703, 2003.

SMITH, D.J. Dental caries vaccines: Prospects and concerns. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, v.13, p.335-349, 2002.

SOARES, B.V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. *Biota Amazonia*, v.3, p.109-123, 2013.

SOKOVIĆ, M., GLAMOČLIJA, J.; MARIN, P.D.; BRKIĆ, D., VAN GRIENSVEN, L.J.L.D. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model, *Molecules*, v.15, p.7532-7546, 2010.

STOEKEN, J.E.; PARASKEVAS, S.; VAN DER WEIJDEN, G.A. The longterm effect of a mouthrinse containing essential oils on dental plaque and gingivitis: a systematic review. *J. Periodontol.*, v.78, p.1218-1228, 2007.

SUSIN, C.; HAAS, A.N.; ALBANDAR, J.M. Epidemiology and demographics of aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*, v.65, p.27-45, 2014.

TAKARADA, K.; KIMIZUKA, R.; TAKAHASHI, N.; HONMA, K.; OKUDA, K.; KATO, T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol. Immun.*, v.19, p.61-64, 2004.

TANZER, J.M.; LIVINGSTON, J.; THOMPSON, A.M. The microbiology of primary dental caries in humans. *J. Dent. Educ.*, v.65, p.1028-1037, 2001.

TAO, N.; JIA, L.; ZHOU, H. Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Food Chem.*, v.153, p.265-271, 2014.

TEN CATE, J.M.; KLIS, F.M.; PEREIRA-CENCI, T.; CRIELAARD, W.; GROOT, P.W. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. *J. Dent. Res.*, v.88, p.105-15, 2009.

TOROGLU, S. In-vitro antimicrobial activity and synergistic/ antagonistic effect of interactions between antibiotics and some spice essential oils. *J. Environ. Biol.*, v.32, p.23-29, 2011.

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MOZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.49, p.2474-2478, 2005.

TUNC, I.; BERGER, B.M.; ERLER F.; DAGLI, F. Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored-product insects. *J Stored Prod Res.*, v.36, p.161–168, 2000.

TUNTIWECHAPIKUL, W.; TAKA, T.; SONGSOMBOON, C.; KAEWTUNJAI, N.; IMSUMRAN, A.; MAKONKAWKEYOON, L.; Pompimon, W.; Lee, T.R. Ginger extract inhibits human telomerase reverse

transcriptase and c-Myc expression in A549 lung cancer cells. *J. Med. Food*, v.13, p.1347-1354, 2010.

UNLU, M.; ERGENE, E.; UNLU, G.V.; ZEYTINOGLU, H.S.; VURAL N. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum*. *Food Chem Toxicol.*, v.48, p.3274-3280, 2010.

URBANIAK, A.; GŁOWACKA, A.; KOWALCZYK, E.; LYSAKOWSKA, M.; SIENKIEWICZ, M. The antibacterial activity of cinnamon oil on the selected gram-positive and gram-negative bacteria. *Med. Dosw. Mikrobiol.*, v.66, p.131-141, 2014.

VADEHTTIN, B.; VAHIT, K. Biochemical and physiological evaluations of limonoids as potential cancer destroyers, *J. Anim. Vet. Adv.*, v.7, p.1099-1107, 2010.

VALMORBIDA, J.; BOARO, C.S.F.; MARQUES, M.O.M.; FERRI, A.F. Rendimento e composição química de óleos essenciais de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes concentrações de potássio. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v.8, p.56-61, 2006.

VAN HOUTE J. Microbiological predictors of caries risk. *Adv. Dent. Res.*, v.7, p.87-96, 1993.

VASCONCELOS, K.R.F.; VEIGA JUNIOR, V.F.; ROCHA, W.C.; BANDEIRA, M.F.C.L. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.18, p.733-738, 2008.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; CABO, M.L.; RODRÍGUEZ-HERRERA, J.J. Antimicrobial activity of essential oils against *Staphylococcus aureus* biofilms, *Food Sci. Techn. Int.*, v.21, p.559-570, 2015.

VIEIRA, S.C.H.; SÓLON, S.; VIEIRA, M.C.; ZÁRATE, N.A.H. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.20, p.28-34, 2010.

VILLENA, R.; CORRÊA, M.S. Flúor – Aplicação Tópica. En: *Odontopediatria na primeira infância*. Editora Santos. São Paulo, p. 315-342, 1998.

VLASE, L.; BENEDEC, D.; HANGANU, D.; DAMIAN, G.; CSILLAG, I.; SEVASTRE B.; MOT, A.C.; SILAGHI-DUMITRESCU, R.; TILEA, I. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities and phenolic profile for *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* and *Teucrium chamaedrys*. *Molecules*, v.19, p.5490-5507, 2014.

WANG, Z.; SHEN Y.; HAAPASALO M. Dental materials with antibiofilm properties. *Dent. Mater.*, v.30, p.1-16, 2014.

WARA-ASWAPATI, N.; KRONGNAWAKUL, D.; JIRAVIBOON, D.; ADULYANON, S.; KARIMBUX, N.; PITIPHAT, W. The effect of a new toothpaste containing potassium nitrate and triclosan on gingival health, plaque formation and dentine hypersensitivity. *J. Clin. Periodontol.*, v.32, p.53-58, 2005.

WASHINGTON, D.C: Fluoride in Drinking Water: A Scientific Review of EPA's Standards, 530 p., 2006.

WOHLEBER, C. Toothpaste: Only recently has it started doing more good than harm. *Am. Herit. Invent. Technol.*, v. 18, p.8-9, 2002.

YANG, L.; LIU, Y.; WU, H.; SONG, Z.; HØIBY, N.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M. Combating biofilms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*, v.65, p.146-157, 2012.

YANG, X.W.; HUANG, X.; AHMAT, M. "New neolignan from seed of *Myristica fragrans*," *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, v.33, p.397-402, 2008.

YE, Q.; JIN, X.; ZHU, X.; LIN, T.; HAO, Z.; YANG, Q. An efficient extraction method for fragrant volatiles from *Jasminum sambac* (L.) Ait. *J. Oleo Sci.*, v.64, p.645-652, 2015.

YEHOUENOU, B.; PHILIPPE, S.; LIMA, H.R.; PIERRE, N.J.; ALAIN, A.G.; FATIOU, T.; DOMINIQUE, S. Chemical composition and antimicrobial activities of *Cinnamomum zeylanicum* Blume dry leaves essential oil against food-borne pathogens and adulterated microorganisms. *Int. Res. J. Biol. Sci.*, v.1, p.18-25, 2012.

ZAIDI, S.F.H.; YAMADA, K.; KADOWAKI, M.; USMANGHANI, K.; SUGIYAMA, T. Bactericidal activity of medicinal plants, employed for the treatment of gastrointestinal ailments, against *Helicobacter pylori*. *J. Ethnopharmacol.*, v.121, p.286-291, 2009.

ZANDI-SOHANI, N.; RAMEZANI, L. Evaluation of five essential oils as botanical acaricides against the strawberry spider mite *Tetranychus turkestanii* Ugarov and Nikolskii. *Int. Biodeter. Biodegr.*, v.98, p.101-106, 2015

ZARRAD, K.; HAMOUDA, A.B.; CHAIEB, I.; LAARIF, A.; JEMÂA. J.M.B. Chemical composition, fumigant and anti-acetylcholinesterase activity of the Tunisian *Citrus aurantium* L. essential oils. *Ind. Crop. Prod.*, v.76, p.121-127, 2015.

ZAURA, E.; KEIJSER, B.J.; HUSE, S.M.; CRIELAARD, W. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol.*, v.9, p.259-271, 2009.

# Anexo

---

## Herbal Dentifrices for Children

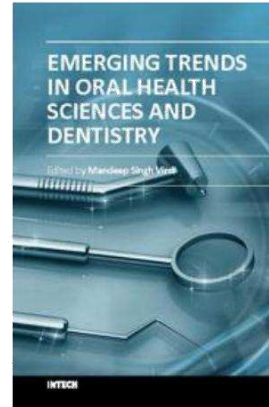
---

Marisa Alves Nogueira Diaz,  
Isabela de Oliveira Carvalho and Gaspar Diaz

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/59812>

---



### 1. Introduction

The use of plant extracts as antimicrobial agents has been increasing every day. Currently, these applications are mainly found in dentistry with the increased use of plant extracts in toothpastes for both adults and children. This finding results from the fact that the oral cavity is considered a favorable environment for the colonization and growth of a wide range of microorganisms, bacteria being the most common [1, 2]. One of the core arguments for the pharmaceutical industry to use toothpastes made from plant extracts is that they can act as antibiotics, analgesics, sedatives, and anti-inflammatories, in addition to being less likely to cause side effects. In the case of toothpastes for children's use where the presence of fluoride can lead to fluorosis, the presence of extracts with antimicrobial activity is quite interesting, given that these combat microorganisms by preventing the formation of biofilms [3].

The presence of microorganisms in the physiology of the oral cavity is essential for normal development, since most species are commensal microorganisms. In some cases, these microorganisms contribute to preventing the establishment of pathogenic microorganisms [4]. However, some of these microorganisms are considered to be opportunistic pathogens that play an important role in the etiology of periodontitis and dental caries, which are believed to be the most prevalent diseases in the world [5]. These microorganisms have also regularly been involved in the etiology of a number of systemic diseases, such as respiratory infections, infective endocarditis, and cardiovascular diseases [6, 7].

Dental caries is a complex oral disease, caused mainly by dental plaque. Dental plaque has been described as an ordered structure in which the primary colonizers are *Actinomyces* and *Streptococci*. These microorganisms bind tightly to one another, in addition to the solid tooth surface, by means of an extracellular matrix consisting of polymers of both host and microbial origin [8-10]. The formation of dental plaque includes a series of steps that begins with the