UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

RITA DE CÁSSIA FABRIS

Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de extratos hidroalcoólicos das folhas de *Myracrodruon urundeuva* All. e *Qualea grandiflora* Mart. sobre *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*

BAURU

2017

RITA DE CÁSSIA FABRIS

Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de extratos hidroalcoólicos das folhas de *Myracrodruon urundeuva* All. e *Qualea grandiflora* Mart. sobre *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração Biologia Oral.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Magalhães

Versão Corrigida

BAURU

2017

F115c Fabris, Rita de Cássia
Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de extratos hidroalcoólicos das folhas de *Myracrodruon urundeuva* All. e *Qualea grandiflora* Mart. sobre *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei* / Rita de Cássia Fabris. – Bauru, 2017.

104 p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru.
Universidade de São Paulo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Magalhães

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais
José e Helena, meu esposo João
Marcelo e minha filha Júlia.*

AGRADECIMENTO

Em primeiro lugar à Deus que me deu forças e iluminou o meu caminho durante esta caminhada.

Ao meu esposo João Marcelo e minha filha Júlia, que amou tanto, obrigada pelo carinho, paciência e pela capacidade de me trazer paz e alegria nas horas difíceis.

Aos meus pais José (em memória) e Helena, meus irmãos Rogério, Fabiana, Ricardo, Francine e Joselene, meus cunhados Rafael e Fernando que com muito carinho, paciência e apoio não mediram esforços para que eu concluísse mais esta etapa da minha vida.

Aos meus sogros João e Maria José, minhas cunhadas Michele e Marina e meu cunhado André, obrigada pela compreensão e dedicação em cuidar da minha filha nos momentos em que eu estava ausente.

À minha querida orientadora Dr^a Ana Carolina Magalhães, meu muito obrigada pelos ensinamentos, paciência, dedicação pois sem sua ajuda não seria possível finalizar este trabalho. Você é uma pessoa iluminada, que Deus te abençoe!

Ao professor Dr. Rodrigo Cardoso pelas palavras de incentivo e colaboração para o sucesso deste trabalho.

À Dr^a Flaviana Bombarda de Andrade pela colaboração nos fornecendo as cepas bacterianas para nossos experimentos.

Ao Marcelo Milanda Ribeiro Lopes (CIP) pela importante colaboração e paciência durante toda minha jornada.

Meu agradecimento especial à doutoranda Juliana Pires pela importante colaboração para a finalização desta tese.

À querida Sara Salustiano Zabini pela ajuda indispensável na idealização deste trabalho.

A querida amiga Priscila Salomão por ter me recebido com tanto carinho na Bioquímica.

À mestrande Aline Braga e à doutoranda Cíntia Tokuhara pela colaboração e palavras de incentivo quando eu já estava sem esperanças.

Aos queridos Dalva de Oliveira e André da Silva pelo carinho, colaboração e incentivo que foram essenciais para eu finalizar meu doutorado.

Às funcionárias da Pós-graduação, Fátima e Leila pelo incentivo e colaboração.

E à todos que direta ou indiretamente contribuíram na finalização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- <i>Myracrodruon urundeuva</i> All.....	55
Figura 2	- <i>Qualea grandiflora</i> Mart.....	55
Figura 3	- Extrato de <i>Myracrodruon urundeuva</i> All	56
Figura 4	- Extrato de <i>Qualea grandiflora</i> Mart.....	56
Figura 5	- Espectrofotômetro Beckman Coulter.....	57
Figura 6	- Microplacas de 96 poços (Experimento em álcool da <i>M. urundeuva</i> contra <i>S. mutans</i>).....	58
Figura 7	- Leitor de microplaca Synergy H1- Biotek.....	59
Figura 8	- Placa com BHI para determinação da CBM. As letras e números representam os poços da microplaca utilizada para determinação da CIM.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Médias de absorvância (n=3/experimento) encontradas nos dois experimentos realizados com diferentes concentrações do extrato <i>M. urundeuva</i> (BHI) contra <i>S. mutans</i>	63
Tabela 2	- Médias de absorvância (n=3/experimento) encontradas nos dois experimentos realizados com diferentes concentrações do extrato <i>Q. grandiflora</i> (BHI) contra <i>S. mutans</i> . Os valores de CBM referentes à CHX não foram similares aos outros experimentos, por isso, não foram considerados.....	64
Tabela 3	- Médias de absorvância (n=3/experimento) encontradas nos dois experimentos realizados com diferentes concentrações do extrato <i>M. urundeuva</i> (BHI) contra <i>L. casei</i>	65
Tabela 4	- Médias de absorvância (n=3/experimento) encontradas nos dois experimentos realizados com diferentes concentrações do extrato <i>Q. grandiflora</i> (BHI) contra <i>L. casei</i>	66
Tabela 5	- Médias de absorvância (n=3/experimento) encontradas nos três experimentos realizados com diferentes concentrações do extrato <i>M. urundeuva</i> (álcool) contra <i>S. mutans</i>	67
Tabela 6	- Médias de absorvância (n=3/experimento) encontradas nos três experimentos realizados com diferentes concentrações de extrato <i>Q. grandiflora</i> (álcool) contra <i>S. mutans</i>	68
Tabela 7	- Médias de absorvância (n=3/experimento) encontradas nos três experimentos realizados com diferentes concentrações de extrato <i>M. urundeuva</i> (álcool) contra <i>L. casei</i>	69
Tabela 8	- Médias de absorvância (n=3/experimento) encontradas nos três experimentos realizados com diferentes concentrações de extrato <i>Q. grandiflora</i> (álcool) contra <i>L. casei</i>	70
Tabela 9	- Resultados da CIM e CBM dos extratos contras os microrganismos.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	microgramas
<i>A. gratissima</i>	<i>Aloysia gratissima</i>
<i>A. indica</i>	<i>Azadirachta indica</i>
ATCC	American Type Culture Collection
<i>B. dracunculifolia</i>	<i>Baccharis dracunculifolia</i>
BHI	Brain Heart Infusion
<i>C. articulatus</i>	<i>Cyperus articulatus</i>
<i>C. sativum</i>	<i>Coriandrum sativum</i>
Ca	Cálcio
CA	cárie ativa
CAC	Lesão cavitada
CAS	Área de referência hígida
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CF	Livre de cárie
CFS	Superfície hígida
CHX	Clorexidina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CO ₂	Gás carbônico
CPC	Cloreto de cetilpiridínico
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
ECC	Cárie precoce da infância
EtOH	Abreviação de álcool
F	Flúor
h	Hora
<i>I. viscosa</i>	<i>Inula viscosa</i>
IML	Perda mineral integrada
IPMP	isopropilmetilfenol
Kg	quilogramas
l	litros

<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>L. sidoides</i>	<i>Lippia sidoides</i>
LD	Profundidade da lesão
<i>M. elengi</i>	<i>Mimusops elengi</i>
<i>M. glomerata</i>	<i>Mikania glomerata</i>
<i>M. urundeuva</i>	<i>Myracrodruon urundeuva</i>
mg	miligramas
ml	mililitros
mm	milímetros
MSB	Mitis salivarius bacitracina
MTT	Método colorimétrico para avaliar viabilidade celular
NaF	Fluoreto de Sódio
nm	nanômetro
<i>O. sanctum</i>	<i>Ocimum sanctum</i>
OCT	Dihidrocloridrato de octenidina
OE	Óleos essenciais
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Fósforo
<i>P. americana</i>	<i>Phytolacca americana</i>
PBS	Tampão fosfato-salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEC	Polissacarídeos extracelulares
PHBM	Polihexametileno biguanida
Pi	Fósforo inorgânico
PIC	Polissacarídeos intracelulares
<i>Q. grandiflora</i>	<i>Qualea grandiflora</i>
qRT-PCR	PCR- real time
RNA	Ácido ribonucleico

s	Segundos
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>S. salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>S. sanguinis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>S. sobrinus</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>
S-ECC	Cárie precoce da infância severa
SMC	Microdureza da superfície do esmalte
<i>T. cardifolia</i>	<i>Tinospora cardifolia</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônias

RESUMO

A cárie dentária é uma doença bucal de alta prevalência e impactante em países em desenvolvimento. É causada pela presença de biofilme dentário rico em bactérias acidogênicas e acidúricas, como *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*. Neste sentido, a fitoterapia tem sido aplicada na odontologia devido ao seu conhecido efeito antimicrobiano, tendo potencial para prevenir doenças como a cárie dentária. Portanto, o presente estudo tem como objetivo testar o potencial antimicrobiano de extratos bruto e etanólico das folhas de *Myracrodruon urundeuva* (*M. urundeuva*) e *Qualea grandiflora* (*Q. grandiflora*) sobre *S. mutans* e *L. casei*. Para tal, determinaram-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM). A CIM foi definida como a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir 100% o crescimento microbiano (absorbância) em relação aos controles negativos. Para a CBM, alíquotas foram removidas dos poços que não apresentaram nenhuma absorbância (viabilidade, concentrações $\geq$ CIM) e semeadas em placas de ágar BHI, incubadas por 24 h a 37°C em estufa de CO₂ 5%. A CBM foi determinada considerando a menor concentração dos extratos capaz de impedir o crescimento bacteriano visível. Cepas de *S. mutans* (ATCC 21175) e *L. casei* (ATTC 334) foram ativadas em BHI e caldo Rogosa, respectivamente. A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas de 96 poços (100 µl de extrato + 80 µl BHI/Rogosa + 20 µl da bactéria diluída em BHI/Rogosa equivalente a 5×10^5 UFC/mL), as quais foram incubadas por 24 h (*S. mutans*) e 48 h (*L. casei*) a 37°C em estufa de CO₂ 5%. Os extratos de *M. urundeuva* e *Q. grandiflora* inicialmente foram diluídos em BHI/Rogosa variando as concentrações entre 2 mg/ml a 0,00012207 mg/ml e os mesmos extratos diluídos em álcool foram avaliados nas concentrações entre 20 mg/ml a 0,00244 mg/ml para *S. mutans* e *L. casei*. Não foi possível determinar a CIM e a CBM para os extratos diluídos no BHI/Rogosa. Foram utilizados como controle positivo a clorexidina e como controles negativos BHI/Rogosa com e sem álcool a 5%. As CIMs (CBMs) da *M. urundeuva* e *Q. grandiflora*, diluídas em álcool, e clorexidina contra *S. mutans* foram 2,5 mg/ml (2,5 mg/ml), 5,0 mg/ml (--) e 0,00468 mg/ml (0,00937 mg/ml), respectivamente. Em relação ao *L. casei*, as CIMs (CBMs) da *M. urundeuva* e *Q. grandiflora*, diluídas em álcool, e da clorexidina foram 0,156 mg/ml (0,312 mg/ml), 0,156 – 0,625 mg/ml (0,312 – 0,625mg/ml) e 0,00468 mg/ml (0,3 mg/ml), respectivamente. Como conclusão, nosso estudo mostrou que *L. casei* (ATTC 334) é mais susceptível aos extratos que

S. mutans (ATCC 21175) e o extrato *M. urundeuva* apresenta melhor efeito antimicrobiano que a *Q. grandiflora* em *S. mutans* (ATCC 21175), porém os dois extratos apresentam efeito similar sobre *L. casei* (ATTC 334) e ambos foram inferiores à CHX.

Palavras chave: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Myracrodruon urundeuva* All., *Qualea grandiflora* Mart., Testes de sensibilidade microbiana, Fitoterapia.

ABSTRACT

Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of hydroalcoholic extracts of *Myracrodruon urundeuva* All. and *Qualea grandiflora* Mart. leaves on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus casei*

Dental caries is an oral disease of high prevalence and impact in developing countries. It is caused by the presence of a dental biofilm rich in acidogenic and aciduric bacteria, such as *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus casei*. Accordingly, phytotherapy has been applied in dentistry due to its known antimicrobial effect, having potential to prevent diseases such as dental caries. Therefore, the present study aims to test the antimicrobial potential of crude and ethanolic extracts of *Myracrodruon urundeuva* (*M. urundeuva*) and *Qualea grandiflora* (*Q. grandiflora*) leaves on *S. mutans* and *L. casei*. For this, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were determined. MIC was defined as the lowest concentration of the antimicrobial agent capable of inhibiting 100% the microbial growth in comparison to the negative controls. For MBC, aliquots were removed from the wells that did not show any absorbance (viability, concentrations $\geq$ than MIC) and seeded on BHI agar plates, incubated for 24 h at 37°C and 5% CO₂. The MBC was determined considering the lowest concentration of extracts capable of preventing visible bacterial growth. Strains of *S. mutans* (ATCC 21175) and *L. casei* (ATTC 334) were activated in BHI and Rogosa broth. MIC was determined by the dilution technique in 96-wells microplates (100 μ l of extract + 80 μ l BHI/ Rogosa + 20 μ l of bacterium diluted in BHI/Rogosa equivalent to 5×10^5 CFU/ml), which were incubated for 24 h (*S. mutans*) and 48 h (*L. casei*) at 37°C and 5% CO₂. The extracts were firstly diluted in BHI/Rogosa varying the concentrations between 2 mg/mL and 0.00012207 mg/ml; the same extracts were also diluted in alcohol at concentrations ranging from 20 mg/ml to 0.00244 mg/ml and both tested against *S. mutans* and *L. casei*. It was not possible to determine the MIC and MBC for the extracts diluted in BHI/Rogosa. Chlorhexidine was used as positive control, while BHI/Rogosa with or without 5% alcohol were used as negative controls. The MICs (MBCs) of *M. urundeuva* and *Q. grandiflora* diluted in alcohol, and clorexidine against *S. mutans* were 2.5 mg/ml (2.5 mg/ml), 5.0 mg/ml (--) and 0.00468 mg/ml (0.00937 mg/ml), respectively. In respect to *L. casei*, the MICs (MBCs) of *M. urundeuva* and *Q. grandiflora*, diluted in alcohol, and chlorhexidine were 0.156 mg/ml (0.312 mg/ml), 0.156 – 0.625 mg/ml (0.312 – 0.625 mg/ml) and 0.00468 mg/ml (0.3 mg/ml), respectively. In conclusion, our study showed that *L. casei*

(ATTC 334) is more susceptible than *S. mutans* (ATCC 21175) to the extracts and the extract of *M. urundeuva* has a better antimicrobial effect than *Q. grandiflora* against *S. mutans* (ATCC 21175), but both extracts have similar effect on *L. casei* (ATTC 334) and they were inferior to CHX.

Key words: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Myracrodruon urundeuva* All., *Qualea grandiflora* Mart., Microbial sensitivity test, Phytotherapy.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO
2	REVISÃO DE LITERATURA
2.1	Modelos experimentais laboratoriais em Microbiologia para cárie dentária
2.1.1	Fase planctônica
2.1.2	Modelos de biofilme.....
2.1.2.1	Sistema aberto vs. Fechado
2.1.3	Biofilme monoespécie
2.1.4	Biofilme multiespécie.....
2.1.5	Biofilme microcosmo
2.1.6	Biofilme formado <i>in situ</i>
2.1.7	Biofilme formado <i>in vivo</i>
2.2	Agentes antimicrobianos
2.2.1	Convencionais
2.2.2	Naturais
3	OBJETIVO
4	MATERIAL E MÉTODOS.....
4.1	Preparação dos extratos das plantas
4.2	Suspensão bacteriana.....
4.3	Obtenção Concentração Inibitória Mínima (CIM)
4.4	Obtenção Concentração Bactericida Mínima (CBM)
5	RESULTADOS.....
5.1	Experimento com extratos diuídos em BHI
5.2	Experimento com extratos diluídos em álcool
6	DISCUSSÃO
7	CONCLUSÃO
	REFERÊNCIAS

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Cárie dentária é uma das doenças bucais crônicas e multifatoriais mais comuns que afeta populações de diferentes países. O desenvolvimento da cárie dentária é determinado pela coexistência de 3 principais fatores: presença de microrganismos acidogênicos e acidúricos organizados em biofilme, exposição aos carboidratos derivados da dieta (em especial a sacarose) e fatores relacionados ao hospedeiro (com por exemplo, qualidade dos dentes e da salivagem). Fatores sócio-econômicos e comportamentais também são importantes na etiologia da doença e modulam os fatores etiológicos principais (PITTS et al., 2017). A doença cárie é resultado de um desequilíbrio microbiológico induzido pela ingestão frequente do açúcar. Microrganismos cariogênicos produzem ácidos láctico, fórmico, acético e propionico, os quais são produtos do metabolismo de carboidratos. A presença destes ácidos reduz o pH do biofilme abaixo de 5,5, resultando na desmineralização dos cristais de hidroxiapatita das camadas de esmalte e destruição da estrutura dentária (LARSEN e FIEHN, 2017).

Microrganismos como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus*, *Rothia dentocariosa*, *Propionibacterium*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Bifidobacterium*, *Scardovia* e *Enterococcus faecalis* são associados com a etiologia da cárie dentária (KARPINSKI e SZKARADKIEWICZ, 2013). Apesar da complexidade da microbiota bucal, há evidências convincentes que *S. mutans* e *L. casei*, bactérias acidogênicas e acidúricas, são os principais microrganismos envolvidos na etiologia da cárie dentária (FEJERSKOV e KIDD, 2005; NAMITA et al., 2012; TEHRANI et al., 2011; STRUZYCKA, 2014).

S. mutans é considerada a principal bactéria envolvida na etiologia da cárie dentária (ANITA et al., 2014; MOGEN et al., 2015), são cocos gram-positivos anaeróbios facultativos presentes na cavidade bucal (BEHESHTI-ROUY et al., 2015), capazes de produzir ácido, sobreviver em um pH baixo e utilizar a sacarose para sintetizar PECs, que são em sua maioria glicanos sintetizados pela atuação das glicosiltransferases (GTFS) (BOWEN e KOO, 2011). O PEC, especialmente o insolúvel, pode promover a adesão seletiva e acúmulo de um grande número de bactérias, contribuindo para a formação e maturação de biofilme cariogênico (VACCA-SMITH e BOWEN, 1998; VACCA-SMITH et al., 1996).

Lactobacillus são bactérias gram-positivas, nas formas não esporulada, bacilo ou cocobacilo, anaeróbias aerotolerantes e catalase-negativas. Atualmente compreendem 224 espécies, sendo o grupo mais numeroso de bactérias produtoras de ácido láctico. O ácido láctico é o principal produto final da fermentação dos açúcares e é responsável pelo desenvolvimento da cárie dentária (AXELSSON, 2004). Estas espécies microbianas são encontradas especialmente em lesões cavitadas, são consideradas colonizadoras secundárias do biofilme cariogênico e, devido às características acidogênicas, contribuem para progressão da desmineralização (FEJERSKOV e KIDD, 2005). O pH ideal de crescimento destas bactérias é entre 4,5 e 6,4, embora existam cepas capazes de suportar pH iguais ou inferiores a 4,0, sendo consideradas espécies acidúricas (ROSEBURY, 1932; van HOUTE, 1980). *Lactobacillus* podem colonizar a cavidade bucal a partir do primeiro ano de vida (McCARTHY et al., 1965), assim como idosos podem apresentar um número maior desta bactéria na saliva, provavelmente devido à utilização de próteses parciais ou totais (NARHI et al., 1999). Dentre as espécies, *L. casei* e *L. paracasei* têm sido reportadas como as principais representantes desta bactéria na etiologia da cárie dentária (BYUN et al., 2004). Adicionalmente, são capazes de inibir o crescimento de *S. mutans*, sendo *L. paracasei*, *L. plantarum* e *L. rhamnosus* as espécies com capacidade máxima de interferência contra *S. mutans* (SIMARK-MATTSON et al., 2007).

Para controle das bactérias presentes na boca, as quais apresentam potencial para causar doenças, vários agentes antimicrobianos têm sido testados. A clorexidina (CHX) na Odontologia, entre os agentes antimicrobianos disponíveis, é a mais utilizada, sendo considerada o padrão ouro (JONES, 1997; PARWANI et al., 2013), entretanto, seu uso contínuo faz com que ocorra uma série de eventos colaterais indesejados (ZHENG e WANG, 2011) como indução de alteração de paladar, manchamento dos dentes e desequilíbrio da microbiota bucal (DINIZ et al., 2010). Adicionalmente, não há evidência científica convincente que a aplicação de clorexidina, como verniz, por exemplo, seja capaz de reduzir o desenvolvimento de cárie em crianças e adolescentes (ASHLEY, 2010; JAMES et al., 2010; TWETMAN, 2004).

A inibição do crescimento de bactérias cariogênicas por agentes antimicrobianos alternativos tem sido extensivamente investigada na tentativa de se obter um agente com uma ampla efetividade e sem efeitos colaterais. Neste sentido, institutos de pesquisas públicas e

privadas estão empenhados em testar o efeito de extratos vegetais e compostos naturais contra patógenos dentários (PATRA et al., 2014).

O uso de plantas medicinais é datado em manuscritos desde 1.500 anos a.C. (BETTEGA et al., 2011). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 3,5 bilhões de pessoas acreditam na eficácia das ervas medicinais e estima-se que 65 a 80% da população usam plantas como a única fonte para tratar diferentes problemas de saúde (GERA et al., 2003; WHO, 2002).

O Brasil apresenta a maior diversidade vegetal do mundo com inúmeras experiências vinculadas ao conhecimento popular das plantas medicinais e tecnologia para correlacionar o saber popular e científico (SANTOS et al., 2009). A prática da fitoterapia vem recebendo amparo legal significativo nos últimos anos. Foram identificadas diversas plantas medicinais com várias indicações diferentes para uso na Odontologia (OLIVEIRA et al., 2007; SOYAMA, 2007). No entanto, detalhes relacionados às propriedades biológicas das plantas permanecem ainda sem esclarecimentos (BELLIK et al., 2012).

Myracrodruon urundeuva All. e *Qualea grandiflora* Mart. são algumas das plantas que estão sendo estudadas. A *Myracrodruon urundeuva* All. (também conhecida pelos nomes populares de aroeira, aroeira-do-sertão, aroeira-do-campo, aroeira-da-serra, urindeúva), pertencente à família Anacardiaceae, gênero *Myracrodruon*, foi descrita por Manoel Freire Allemão (FREIRE ALLEMÃO, 1862). É encontrada no nordeste do país, oeste dos estados da Bahia, Minas Gerais, São Paulo e sul dos estados do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás (LORENZI, 2002). Seus componentes químicos são flavonoides, incluindo biflavonóides, terpenos, xantonas, chalconas urundeuvinas I, II e III (BOTELHO et al., 2007) e também lipídios totais e fenólicos (GEBARA et al., 2011; NAWWAR et al., 2011), além de derivados do ácido gálico (SOUZA, 2012). A aroeira tem inúmeras utilidades (MACHADO e OLIVEIRA, 2014) e tem sido usada para o tratamento de sangramento gengival e ginecológico (MONTEIRO et al., 2006), como anti-inflamatório, analgésico e cicatrizante no tratamento de gastrites, úlceras gástricas e hemorroidas (CARLINI et al., 2010), para dor de cabeça, dor de dente e como antisséptico (CARTAXO et al., 2010). O extrato das cascas tem efeito bactericida e bacteriostático sobre bactérias e leveduras planctônicas da cavidade bucal (ALVES et al., 2009).

A espécie *Qualea grandiflora* Mart. (conhecida popularmente como pau-terra, pau-terra-do-campo, pau-terra-do-cerrado, pau-terra-da-folha-larga, ariavá, entre outros), pertencente à família Vochysiaceae (CORRÊA, 1978) é considerada símbolo do cerrado (ALMEIDA et al., 1998). Os compostos químicos presentes na *Qualea grandiflora* Mart. são taninos, catequinas, esteroides, terpenos e saponinas (HIRUMA-LIMA et al., 2006). É utilizada no tratamento de diarreia, cólicas intestinais, contra protozoários, para a limpeza externa de úlceras e feridas e no tratamento de doenças inflamatórias (RODRIGUES e CARVALHO, 2001), além de ter ação antiulcerogênica e antibacteriana (HIRUMA-LIMA et al., 2006).

Tendo em vista a busca por agentes naturais e a alta prevalência de cárie em populações específicas (MARCENES et al., 2013), torna-se interessante testar o efeito da *Myracrodruon urundeuva* All. e *Qualea grandiflora* Mart. sobre a viabilidade de bactérias potencialmente cariogênicas. Em relação ao extrato de *Myracrodruon urundeuva* All., apenas um estudo testou seu efeito na viabilidade de *S. mutans* e *L. casei* em fase planctônica (ALVES et al., 2009), porém utilizando o método de inibição por halo, com pouca descrição metodológica, especialmente relacionada à forma de extração e ao preparo dos extratos. Em relação à *Qualea grandiflora*, esta foi testada contra bactérias não relacionadas à cárie dentária como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* e *Helicobacter Pylori* em fase planctônica (BONACORSI et al., 2013; MOURA et al., 2012). Portanto, a literatura é escassa em relação ao efeito destes agentes naturais sobre bactérias cariogênicas.

Portanto, o objetivo desta tese foi comparar o efeito antimicrobiano dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Myracrodruon urundeuva* All. e *Qualea grandiflora* Mart, pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), comparando-os ao controle positivo (clorexidina) e aos controles negativos (BHI/Rogosa com e sem etanol 5%) sobre *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*.

É importante destacar que não há nenhum trabalho nesta linha de pesquisa que testou o efeito destes extratos sobre bactérias cariogênicas. Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado com estes extratos no que diz respeito à citotoxicidade (MACHADO et al., 2016a,b; SANTESSO et al., 2016; TOKUHARA et al., 2016), assim como na prevenção da cárie em esmalte utilizando um modelo de biofilme microcosmo. Desta forma, os resultados deste estudo complementarão os dados coletados pelo grupo de pesquisa (biofilme microcosmo

mais complexo versus bactérias cariogênicas na fase planctônica) e poderão auxiliar no entendimento do potencial antimicrobiano destes extratos especificamente sobre estes dois grupos de bactérias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Modelos experimentais laboratoriais em Microbiologia para cárie dentária

2.1.1 Fase planctônica: envolve o cultivo de microrganismos dispersos em ambiente aquoso (HUANG et al., 2011), a partir do qual é possível determinar a inibição por teste de difusão (CLSI, 2014) e as CIM (concentração inibitória mínima) e CBM (concentração bactericida mínima) dos agentes antimicrobianos. É um método simples, barato e rápido para obter as primeiras informações sobre o efeito antimicrobiano do agente, servindo para selecionar as concentrações dos agentes a serem testadas em modelos mais complexos, envolvendo a formação de biofilme.

2.1.2 Modelos de biofilme: Por muitos anos, o ecossistema bucal foi estudado com uma abordagem reducionista, na qual microbiologistas estudaram espécies bacterianas individuais e isoladas. Esta estratégia permitiu rever e entender todos os diferentes componentes deste ecossistema, mas sem ser capaz de explicar como bactéria pode formar o biofilme ou de entender o seu funcionamento. O desenvolvimento de modelos experimentais de biofilmes dentários foi essencial para um melhor entendimento do efeito antimicrobiano dos agentes testados *in vivo*, uma vez que a eficácia encontrada na fase planctônica não é reproduzida sobre o biofilme, já que este permite proteção da bactéria que se torna menos susceptível aos efeitos dos agentes antimicrobianos. A concentração inibitória de um agente antimicrobiano sobre o biofilme pode chegar a ser 1.000 x maior que a encontrada na fase planctônica. Múltiplos modelos de formação de biofilme *in vitro* surgiram, cada um deles especialmente adaptado para observar a formação do biofilme composto por bactérias específicas dentro de um ambiente controlado (DARRENE e CECILE, 2016).

Os modelos de biofilme mais utilizados, experimentalmente, são os de única-espécie (monoespécie), no caso a espécie mais estudada é *S. mutans* (CURY et al., 2000; KOO et al., 2003; STEINER-OLIVEIRA et al., 2011), ou os multiespécies, os quais associam duas ou mais espécies bacterianas ou bactérias com fungos, como exemplo, biofilme com *S. Mutans*, *S. sobrinus* e *S. oralis* (SHU et al., 2000; YANG et al., 2011) e o microcosmo que é formado *in vitro* a partir de contaminação com saliva ou biofilme coletado *in vivo* (AZEVEDO et al., 2011; SIGNORI et al., 2016).

2.1.2.1 Sistema aberto vs. Fechado: Em geral, modelos de biofilme *in vitro* podem ser amplamente categorizados em sistema “fechado” ou “aberto” dependendo da disponibilidade de nutrientes (SIM et al., 2016). O sistema fechado é conhecido por não ter renovação de nutrientes. A bactéria é exposta continuamente ao mesmo nutriente, sendo este consumido com o tempo, reduzindo a sua disponibilidade para o crescimento do biofilme. Este método pode ser realizado em placa de ágar, que é o modelo mais simples no qual a bactéria pode crescer em ágar que simula a matriz extracelular (BURNS et al., 1996). Também podem ser utilizadas placas de cultura celular, onde as bactérias formam o biofilme sobre uma estrutura sólida, possibilitando análises de produtos metabólitos ou de constituintes importantes do biofilme (ROBERTS et al., 2002). O sistema aberto permite renovação de nutrientes, sendo dividido em categorias: 1) crescimento de biofilme com quimiostático, que utiliza um biorreator o qual permite que a taxa de fluxo de entrada de nutrientes seja similar ao fluxo de saída de metabólitos, mantendo um volume de cultura constante (NOVICK e SZILARD, 1950); 2) fluxo de células é um modelo de biofilme que consiste na presença de um reservatório para meio de cultura líquido, único ou múltiplo, em uma câmara transparente. Primeiramente há a inoculação das bactérias, pela passagem do meio de cultura através do fluxo de células, facilitando a aderência das bactérias à estrutura sólida, depois há passagem do meio de crescimento (nutrientes) (HERLES et al., 1994); 3) fermentador de filme com profundidade constante permite controlar o crescimento do biofilme em espessura através do fornecimento controlado de bactérias e nutrientes (ATKINSON e FOWLER, 1974); e 4) a boca artificial que simula o ambiente microbiano bucal sob condições experimentais controladas, permitindo o crescimento de microrganismos como biofilme sobre dente em superfícies irrigadas com nutrientes e saliva (WIMPENNY, 1997).

2.1.3 Biofilme monoespécie: biofilme envolvendo apenas uma bactéria, sobre o meio seletivo para que haja crescimento específico (DARRENE e CECILE, 2016). Desta forma, é possível averiguar a resposta de um microrganismo específico às condições do ambiente. O modelo monoespécie pode ser vantajoso quando se objetiva compreender o comportamento de uma espécie mediante à diferentes desafios cariogênicos. No entanto, a utilização de monoespécie para desenvolvimento de cárie *in vitro* apresenta desvantagem de não levar em consideração as interações que podem acontecer entre os microrganismos durante a formação do biofilme (ARTHUR et al., 2013).

Ccahuana-Vásquez e Cury (2010) validaram um modelo de biofilme monoespécie (*S. mutans*), para demonstrar a suscetibilidade deste à agentes antimicrobianos e permitir a avaliação do potencial anticárie. O biofilme *S. mutans* (UA 159) foi cultivado sobre blocos de esmalte bovino suspensos verticalmente no ultrafiltrado de extrato de levedura e triptona de caldo de carne a 37°C, 10% CO₂ por 5 dias, e expostos 8x/dia a sacarose 10% por 1 minuto. Após 48 h iniciais, o crescimento de 4 biofilmes foram interrompidos, sendo os outros cultivados por mais 3 dias e tratados 2x/dia com CHX a 0,012%, 0,024% e 0,12% e NaF 0,05% por 1 min. Foram determinadas a biomassa, bactérias viáveis e composição bioquímica de todas as amostras de biofilme. O pH do meio de cultura foi medido diariamente como indicador de acidogenicidade do biofilme. O grupo tratado com CHX mostrou efeito dose-resposta diminuindo a viabilidade, a biomassa bacteriana e a desmineralização do esmalte ($p<0.05$). O grupo tratado com NaF a 0,05% não mostrou efeito antimicrobiano, mas foi capaz de reduzir a desmineralização de forma similar à CHX 0.12%. Os autores concluíram que o modelo desenvolvido tem potencial para avaliar o efeito de diferentes agentes sobre o crescimento do biofilme e sobre a desmineralização do esmalte.

2.1.4 Biofilme multiespécie: De acordo com YANG et al (2011), o biofilme multiespécie é composto por comunidades dinâmicas com extensivas interações entre duas ou mais espécies. O comportamento biológico dos diferentes microrganismos no biofilme multiespécie, seja através de cooperação ou competição, nos dá importantes informações para o controle do desenvolvimento da cárie dentária. Apesar de ser mais simples e não apresentar uma ecologia microbiana tão complexa quanto o protocolo microcosmo, o biofilme multiespécie permite o desenvolvimento de lesões cariosas em um ambiente microbiano controlado (ARTHUR et al., 2013). Estes autores realizaram um trabalho utilizando biofilme multiespécie de *L. casei*, *S. mutans*, *S. salivarius* e *S. sanguinis* sobre blocos de esmalte cobertos por película adquirida, para produção de lesões cariosas, variando as concentrações de sacarose (0,5 e 1,0%), fluoreto (0,4, 0,8 e 1,0 ppm F) e cálcio (1,0 e 2,0 mM de Ca), sendo que o meio de crescimento foi trocado diariamente. Contagem de células viáveis no biofilme, porcentagem de mudança de microdureza (% SMC), profundidade da lesão (LD) e perda mineral integrada (IML) dos blocos de esmalte foram avaliados após 4 dias de formação do biofilme. A quantidade de células viáveis no biofilme foi significativamente afetada pela concentração de sacarose, fluoreto e cálcio ($p<0,05$). Houve uma diminuição na % SMC em resposta ao aumento das concentrações de flúor e cálcio ($p<0,001$). IML ($p <0,001$) e LD ($p <0,05$) menores foram encontradas na presença de 0,8 e 1,0 ppm F. Uma correlação negativa

foi encontrada entre as variáveis de resposta (% SMC, LD e IML) e as concentrações de flúor e cálcio. Os resultados sugeriram que o modelo microbiano de cárie desenvolvido foi capaz de mostrar distintos níveis de inibição de cárie em resposta às concentrações de flúor e cálcio, corroborando com observações clínicas. O efeito da concentração de sacarose no desenvolvimento das lesões de cárie só foi encontrado na presença de concentrações mais baixas de flúor.

2.1.5 Biofilme microcosmo: Neste modelo, a saliva humana ou o biofilme é usado como inóculo para proporcionar o crescimento de um biofilme chamado microcosmo, contendo microrganismos encontrados na cavidade bucal. Este modelo permite simular uma situação mais próxima do que ocorre *in vivo* em comparação ao uso do biofilme monoespécie (AAS et al., 2005; PRATTEN et al., 2003). Biofilmes microcosmos são similares em composição, crescimento, comportamento, propriedades bioquímicas e provavelmente na complexidade em relação ao biofilme supragengival natural (FILOCHE et al., 2007; MARSH, 1995; ZAURA et al., 2011), independentemente da fonte doadora (saliva vs. biofilme, fonte carie-ativa vs. inativa) (SIGNORE et al., 2016). O principal fator que afeta a cariogenicidade do biofilme microcosmo é a condição de crescimento, em especial a presença de sacarose durante o cultivo *in vitro* (SIGNORE et al., 2016).

Azevedo et al. (2011) compararam os microrganismos e a cariogenicidade do biofilme microcosmo formado a partir da saliva de crianças livres de cárie (CF), crianças com cárie precoce da infância (ECC) e com ECC severa (S-ECC), sob exposição à sacarose regular. Os biofilmes foram cultivados em microplacas de 24 poços sobre o esmalte bovino por até 10 dias em saliva artificial (com e sem sacarose 1%, 6 x/dia), a qual foi substituída diariamente. O valor de pH foi determinado diariamente e, ao final do experimento, o biofilme sobre os discos de esmalte foram recolhidos para análises microbiológicas. A perda mineral do esmalte foi estimada pelo percentual de perda de dureza. Os resultados obtidos mostraram que não houve diferença significativa entre as fontes de saliva ($p>0.05$). Foi verificada maior desmineralização ($p<0.001$) sob exposição à sacarose, independentemente da experiência prévia de cárie dentária da fonte doadora. Concluíram que a exposição à sacarose determina a cariogenicidade dos biofilmes, enquanto a experiência de cárie das crianças doadoras não afeta a sua formação *in vitro*. Estes resultados estão de acordo com um estudo mais recente (SIGNORE et al., 2016).

2.1.6 Biofilme formado *in situ*: No modelo *in situ*, as amostras dentárias são inseridas na cavidade bucal de voluntários, para que sobre elas seja formado o biofilme a partir das bactérias presentes na saliva. As amostras podem ser acopladas em aparelhos palatinos ou mandibulares, com espaço para a formação do biofilme e sua proteção utilizando telas plásticas (CURY et al., 2000; HARA et al., 2003).

Cury et al. (1997) realizaram um estudo para analisar a composição do biofilme formado *in situ* de acordo com a exposição à sacarose. Vinte voluntários, que viviam em região com água fluoretada (0,7 ppmF), participaram de um estudo crossover realizado em 4 fases de 28 dias cada. Para cada fase do estudo, os voluntários utilizaram um aparelho palatino de resina acrílica contendo 4 blocos de esmalte humano protegidos com uma tela plástica, para permitir a formação do biofilme. Uma solução de sacarose 20% foi gotejada sobre os blocos de esmalte de 0 a 8x/dia. Os voluntários utilizaram dentifrício livre de fluoreto durante o experimento apenas para a higienização dos próprios dentes, pois as amostras de esmalte não eram escovadas. Após cada fase as concentrações de Flúor (F), Cálcio (Ca), Fósforo (P) e carboidratos totais foram determinadas no biofilme. Frequente exposição à sacarose reduziu as concentrações de F, Ca e P no biofilme, mas aumentou as concentrações de carboidratos alcalinos-solúveis. Os resultados sugerem que a cariogenicidade do biofilme formado na presença da sacarose não pode ser atribuída somente à maior porosidade, mas também às concentrações inorgânicas mais baixas.

2.1.7 Biofilme formado *in vivo*: estudos *in vivo* têm a vantagem de incluir fatores do hospedeiro envolvendo processo natural de desenvolvimento da cárie dentária, mas têm algumas limitações fundamentais. O ambiente bucal é de difícil controle e a quantidade e qualidade do biofilme pode ser diferente entre as diferentes regiões da boca e entre pessoas. Ainda pode ser modificado por fatores biológicos e comportamentais ao longo do tempo (PRETTY et al., 2005; SCHEIE et al., 1992).

Preza et al. (2009) coletaram biofilme supragengival de 20 indivíduos saudáveis (controles) e 21 indivíduos com cárie radicular (pacientes idosos) com objetivo de definir os perfis bacterianos das superfícies radiculares. Como resultado obtiveram maior diversidade bacteriana nos controles em comparação aos pacientes idosos com lesões cariosas. *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *Pseudoramibacter alactolyticus* foram associados à maioria das amostras de cárie radicular. *S. mutans* foi detectado com maior frequência na dentina infectada do que nas outras amostras, mas a diferença não foi significativa. *Actinomyces* foi

encontrado com maior frequência nos controles (superfícies hígidas). Os autores concluíram que tanto *Actinomyces* como *S. mutans* podem desempenhar papel limitado como agentes patogênicos de cárie radicular.

Henne et al. (2016) realizaram um estudo *in vivo* com 23 pessoas (19 – 49 anos) alocadas em dois grupos de acordo com a experiência de cárie: livre de cárie (CF) e cárie ativa (CA). Os indivíduos CF (n = 10) apresentaram um sítio doador (CFS), ou seja, uma superfície hígida, enquanto que os indivíduos CA (n = 13) apresentaram dois sítios doadores: uma lesão cavitada (CAC), selecionada de acordo com escores Nyvad 3 e ICDAS 5-6 e uma área referência hígida (CAS). Foram selecionadas quatro espécies bacterianas acidúricas/acidogênicas (*Streptococcus mutans*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium dentium* e *Scardovia wiggisiae*) e uma espécie asacarolítica (fusobactérias) como controle negativo. Os genes 16S rRNA (DNA e RNA) foram quantificados por PCR quantitativa. Com base nesses parâmetros, as contagens bacteriana e ribossômica, assim como as atividades relativas, foram calculadas como o quociente da abundância relativa ribossômica e da abundância relativa genômica. Os valores médios das contagens genômicas totais por amostra (mg) diferiram entre os três grupos de amostras (CFS vs. CAS vs. CAC). O número mais alto de bactérias foi encontrado para CAC ($7,4 \times 10^6$ genoma/mg) e CAS ($1,1 \times 10^7$ genoma/ml) enquanto que CFS mostrou o menor número ($3,1 \times 10^6$ genoma/ml). Em contraste, o número total de ribossomos/mg foi diferente na ordem de magnitude, com valores mais altos para CFS ($2,1 \times 10^{10}$ ribossomos/mg) e mais baixo para CAC ($1,5 \times 10^{10}$ ribossomos/mg) e CAS ($1,6 \times 10^{10}$ ribossomo/mg). As bactérias associadas à cárie apresentaram maior atividade relativa nas lesões de cárie (*Lactobacillus* CAC: $177,5 \pm 46,0\%$) e atividades menores nas superfícies hígidas (*Lactobacillus* CAS: $96,3 \pm 31,5\%$), enquanto as fusobactérias asacarolíticas foram mais ativas nas superfícies hígidas e menos ativas em lesões de cárie (CFS: $275,7 \pm 171,1\%$, CAS: $205,8 \pm 114,3\%$, CAC: $51,1 \pm 19,0\%$). Assim, o presente estudo sugere diferentes padrões de atividade para biofilmes de pacientes livres de cárie e cárie ativos.

2.2 Agentes antimicrobianos

2.2.1 Convencionais

Geralmente a eficácia dos antissépticos bucais é atribuída à sua atividade bacteriostática ou bactericida, que deve ser prolongada - característica definida como

substantividade - habilidade que um agente ativo tem de se aderir a superfícies e ser liberado com o tempo, provendo atividade antimicrobiana prolongada (ASADOORIAN, 2006).

A clorexidina (CHX) destaca-se por possuir uma boa eficácia no controle do biofilme (LAWRENCE et al., 2008), por ser uma substância antisséptica de amplo espectro de ação, atuando sobre fungos e bactérias gram positivas e negativas. Embora a CHX seja eficaz sobre diversos microrganismos, alguns já apresentam resistência a este agente antimicrobiano (MARINHO e ARAUJO, 2007).

Silva et al. (2010) realizaram um estudo para investigar a atividade da CHX em *S. mutans* (UA 159) nas formas planctônica e biofilme, em diferentes concentrações e períodos de crescimento. A CIM e CBM da CHX nas células planctônicas e CBM em biofilme foram determinadas pelo método de microdiluição. Para a fase planctônica a CIM foi 2,2 mg/l e a CBM foi 18 mg/l, já a CBM para biofilme foi de 800 mg/l (44,4 x maior que na fase planctônica). A exposição à CHX, nas concentrações de 4,5 mg/l e 9,0 mg/l, reduziu a contagem das células planctônicas em 6 e 20 vezes, respectivamente, e a contagem de células do biofilme foi reduzida 2,5 vezes ou mais em concentrações acima de 500 mg/l. As superfícies celulares na fase planctônica aparentemente não apresentaram modificação quando expostas às concentrações de 4,5 mg/l por 2 ou 4h, mas após 6h várias células apresentaram alteração de forma com material intracelular extravasado. Houve decréscimo no comprimento das cadeias das células e da matriz quando o biofilme foi exposto a 1,1 mg/l e 4,5 mg/l de CHX, respectivamente, enquanto que as concentrações de 1.200 mg/l e 2.000 mg/l causaram extensa precipitação de material desconhecido nas lamínulas. Conclui-se que os efeitos da CHX contra *S. mutans* dependem do tipo de organização celular, período de crescimento e concentração utilizada, sendo que a CHX pode afetar a parede celular e interferir nos mecanismos de formação do biofilme.

A CHX é considerada um agente antimicrobiano padrão-ouro em Odontologia. Portanto, a maioria dos estudos inclui CHX como um controle positivo quando tem como objetivo testar um novo agente antimicrobiano. O cloreto de cetilpiridínio (CPC) é um agente catiônico como a CHX e tem sido utilizado para combater o biofilme e a halitose, com eficácia inferior à CHX devido à baixa substantividade (BLOM et al., 2012). Os óleos essenciais (OE, eucaliptol, timol, salicilato e mentol), agentes não-iônicos, são outros agentes antimicrobianos popularmente utilizados em Odontologia (FU et al., 2014).

Wakamatsu et al. (2014) compararam a cinética de penetração de quatro enxaguatórios bucais (CHX, OE, CPC e isopropilmetilfenol-IPMP) em biofilme monoespécie de *S. mutans*, utilizando microscopia confocal de varredura a laser. O IPMP mostrou penetração mais rápida contribuindo para o rompimento da membrana, a CHX foi insuficiente para erradicar a bactéria do biofilme dentro do tempo usual de aplicação, o CPC mostrou a velocidade de penetração mais baixa entre os enxaguatórios testados enquanto que OE mostrou a melhor penetração, porém dentro de 30 s nenhum dos enxaguatórios testados apresentou efeito antiplaca, mostrando certa limitação dos agentes quando a avaliação é imediata.

Yousefimanesh et al. (2015) realizaram um estudo *in vitro* para investigar os efeitos antibacterianos de 3 enxaguatórios bucais contendo clorexidina (Kin Gingival - Livar/Espanha, Behsa - Behsa/Irã e Boht - Both/Irã) pelo método diluição seriada contra *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. salivarius* e *L. casei*, para determinação da CIM (pela turbidez do tubo contendo caldo tríptico de soja) e CBM (após 24 horas de turbidez, foi transferido para ágar sangue para a determinação do crescimento). As CIMs da Kin Gingival, Behsa e Boht para *S. mutans* foram 0,14, 0,48 e 1.000 µg/ml, respectivamente. A CBM para os enxaguatórios mencionados acima contra *S. mutans* foram 0,23, 1,9 e 2.000 µg/ml, respectivamente. As CIMs dos enxaguatórios do estudo para *S. sanguinis* foram 0,073, 0,48 e 250 µg/ml, respectivamente e as CBMs foram 0,14, 1,9 e 1.000 µg/ml, respectivamente. As CIMs para *S. salivarius* foram 0,073, 0,24, 250 µg/ml, e as CBMs foram 0,14, 0,97, 1.000 µg/ml, respectivamente. Para *L. casei*, as CIMs foram 0,036, 0,12, 500 µg/ml e as CBMs foram 0,073, 0,48, 2.000 µg/ml, respectivamente. Eles concluíram que o enxaguatório Kin Gingival foi mais efetivo que o Behsa e o Both contra microrganismos bucais e *L. casei* foi a bactéria mais susceptível.

Em 2016, Celik et al. avaliaram *in vitro* o efeito antimicrobiano da CHX, do polihexametileno biguanida (PHBM) e do dihidrocloridrato de octenidina (OCT) em microrganismos cariogênicos (*S. mutans*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *Actinomyces viscosus*), pelo método CIM e CBM. A CHX, PHBM e OCT foram diluídos em água destilada até as concentrações finais. Utilizou-se o método de diluição em tubos para as cepas citadas acima e cultivadas em ágar sangue e caldo Mueller-Hinton a 37°C por 48 h. A CIM foi determinada pela leitura em espectrofotômetro. Para determinar a CBM, as amostras que apresentaram turbidez foram transferidas para ágar sangue e avaliou-se crescimento após 24 h. A CIM contra *S. mutans* foi 70 mg/l para CHX, 60 mg/l para PHBM e 120 mg/l para OCT.

A CBM para o mesmo microrganismo foi 60 mg/l para PHBM, 150 mg/l para CHX e 120 mg/l para OCT. Para *L. rhamnosus*, a CIM foi 15 mg/l para PHBM e OCT e 150 mg/l para CHX. A CBM para tal microrganismo foi de 150 mg/l para CHX e 30 mg/l para OCT e PHBM. Em relação ao *L. acidophylus*, a CIM foi 15 mg/l para OCT, 30 mg/l para PHBM e 70 mg/l para CHX. A CBM obtida foi 30 mg/l para OCT e PHBM e 50 mg/l para CHX. Para *A. viscosus*, a CIM e a CBM foram 30 mg/l para OCT, 70 mg/l para CHX e 120 mg/l para PHBM. Os autores concluíram que OCT e PHBM são significativamente efetivos contra microrganismos cariogênicos e podem ser considerados potenciais alternativos à CHX para redução de microrganismos cariogênicos.

2.2.2 Naturais

De acordo com Borhan-Mojabi e Azimi (2013), a demanda global por medidas preventivas alternativas das doenças bucais, que apresentem segurança, eficiência e baixo custo, permitiu o desenvolvimento da fitoterapia. Os medicamentos fitoterápicos são preparações farmacêuticas (extratos, tinturas, pomadas e cápsulas) produzidas a partir de ervas medicinais, obtidas de uma ou mais plantas. A maior vantagem da fitoterapia seria o baixo custo e a consequente maior disponibilidade para a população de baixa renda (CALIXTO, 2000).

A importância da inclusão dos fitoterápicos nos Programas de Farmacovigilância vem sendo reconhecida nos últimos anos por vários países da Europa, como Reino Unido e Alemanha, onde várias plantas foram submetidas à farmacovigilância e muitas delas foram retiradas do mercado devido a importantes efeitos tóxicos e risco para ser humano (SILVEIRA et al., 2008). O uso de plantas medicinais em saúde preventiva e curativa é cercado de recomendações rigorosas. Muitas plantas têm mostrado efeitos adversos como irritação gástrica, lesões no sistema nervoso, hemorragias, irritação na mucosa bucal (JUIZ et al., 2009). Um exemplo é *Glycyrrhiza glabra* L., que devido sua constituição química ter semelhança estrutural ao esteroides, tem sido associada à hipocalcemia, retenção urinária e aumento da pressão sanguínea quando utilizada por longo período de tempo (PINN, 2001). Comprometimento do fígado e danos hepáticos agudos como hepatites têm sido largamente reportados com o uso de plantas contendo alcaloides pirrolizidínicos, principalmente envolvendo plantas como a cavalinha (*Teucrium chamaedrys* L.), confrei (*Symphytum*

officinale L.), valeriana (*Valeriana officinalis* L.), escuteária chinesa (*Scutellaria serbaicalensis* Georgi) (LANGMEAD e RAMPTON, 2001).

Portanto, anteriormente ao uso das plantas na área de saúde humana, deve-se ter conhecimento baseado em evidência científica dos efeitos terapêuticos e colaterais. Nesta revisão abordaremos apenas os efeitos terapêuticos, com ênfase ao efeito antimicrobiano de diferentes plantas em bactérias bucais.

Stryphnodendron adstringens é uma leguminosa do cerrado brasileiro considerada como planta medicinal e recebe várias denominações populares como: alarantemo, barbatimão, charãozinho-roxo, ilatimó, ulatimó, casca do Brasil, casca-da-virgindade e casca da mocidade (CORREA, 1984). Esta planta tem sido utilizada na medicina popular e possui ação cicatrizante, anti-inflamatória, hemostática, anti-edematogênica, antisséptica e anti-diarreica. Também utilizada no tratamento de úlceras, hemorragias vaginais e gonorreia (CAMARGO, 1985). Possui constituintes químicos como: alcaloides, flavanóides, terpenos, estilbenos, esteroides, inibidores de proteases e taninos (VASCONCELOS et al., 2004). Taninos são componentes do barbatimão e têm sido associados aos efeitos antimicrobianos (QUEIROZ et al., 2002). Extratos acêtonicos e semipurificados da casca do barbatimão possuem atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (AUDI et al., 2004). O extrato hidroalcoólico de barbatimão apresentou atividade antimicrobiana com melhores resultados para as cepas de *S. mutans* e *L. casei* com CIM variando de 350 a 400 µg/ml.

A aroeira-do-sertão, é uma árvore que além das propriedades farmacológicas desejáveis também é conhecida pelo seu alto poder sensibilizante e irritante, capaz de ocasionar alergias, reações urticantes, eczemas e dermatites, frequentemente relatados por indivíduos que tiveram contato com a espécie (DIÓGENES e MATOS, 1999). Alves et al. (2009) avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana, antifúngica e antiaderente da casca do caule da aroeira-do-sertão, folhas da malva e goiabeira sobre microrganismos do biofilme dentário (*S. mutans*, *L. casei* e *S. sobrinus*) e da candidose oral (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*), como alternativa terapêutica. Os três extratos hidroalcoólicos apresentaram atividade antiaderente (capacidade de inibir a síntese de glicano pela glicosiltransferase). As atividades antimicrobiana e antifúngica foram determinadas pelo método de difusão em meio sólido para determinação CIM, sendo que todos os extratos foram diluídos em concentrações crescentes até 1:512, a CHX (0.12%) foi utilizada como controle

positivo e a solução hidroalcoólica a 80% como controle negativo. Todas as linhagens foram sensíveis aos extratos, porém *L. casei* foi o mais sensível quando testada com aroeira-do-sertão, *S. mutans* foi mais sensível ao extrato da goiabeira e quanto ao extrato da malva, *S. mutans* e *S. sobrinus* foram mais sensíveis. Na atividade antiaderente, os três extratos apresentaram atividade antiaderente, representada pela ausência de aderência na parede do tubo de vidro. A aroeira-do-sertão, a malva e a goiabeira apresentaram atividade antifúngica sobre as cepas de *Candida* analisadas no estudo.

Os efeitos e propriedades do extrato de aroeira-do-sertão e aroeira-da-praia foram testados em outras aplicações na área da saúde, com efeito antiulcerogênico e protetor da mucosa gástrica (CARLINI et al., 2010). No estudo de Rodrigues et al. (2001) foi demonstrado efeito anti-inflamatório da aroeira-do-sertão no tratamento de colites em ratos.

Menezes et al. (2010) avaliaram a ação dos extratos aquosos das folhas de araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) e aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão) em animais experimentais submetidos a um desafio cariogênico. Os dois extratos testados produziram uma redução substancial da microbiota cariogênica (*S. mutans*) nos animais experimentais, afetando positivamente a dureza superficial do esmalte. A aroeira tem mostrado bons resultados em pesquisas envolvendo o seu efeito antimicrobiano (MACHADO e OLIVEIRA, 2014).

Própolis, é um produto natural não tóxico de colmeia, que tem mostrado reduzir a incidência de cáries em ratos (IKENO et al., 1991) e o acúmulo de biofilme supragengival *in vivo* (KOO et al., 2002). É uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico coletado pelas abelhas dos ramos, flores, pólen, brotos e exsudato de árvores. A composição química da própolis inclui flavonoides, ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, terpenóides e fenilpropanóides, esteroides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e vários outros componentes em pequenas quantidades (HU et al., 2005; HAYACIBARA et al., 2005; MATSUDA et al., 2002; OKZUL et al., 2004; ROCHA et al., 2003). Aos ácidos fenólicos são atribuídas às propriedades antibacteriana, antiviral e antioxidante (VOLPI e BERGONZINI, 2006).

Aguiar e Saliba (2004) realizou um estudo com oitenta recrutas de dezoito anos do Tiro de Guerra de Araçatuba/SP, coletando amostras de saliva por 28 dias de escovação com um dentífrico de baixa abrasividade (grupo 1: 40 voluntários) e com óleo de amêndoa (titoil)

(grupo 2: 40 voluntários). Houve uma redução significativa das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/ml) de *S. mutans* (biofilme) em ambos os grupos, porém o titoil foi mais efetivo na redução da quantidade de bactérias comparado ao dentífrico de baixa abrasividade.

A espécie *Qualea grandiflora* Mart. tendo sido aplicada no combate aos microrganismos patogênicos (SILVA JUNIOR, 2005). Moura et al. (2012) realizaram testes com extrato hidroalcóolico da casca da *Q. grandiflora* em relação à atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas (*S. aureus* e *S. pyogenes*) e gram-negativas. Neste estudo encontrou-se baixa ou ausência de atividade inibitória do extrato etanólico de *Q. grandiflora* sobre bactérias gram-negativas (especialmente *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*), o que pode estar relacionada às diferenças estruturais que estas bactérias apresentam em relação às gram-positivas (presença de membrana externa rica em peptidoglicano, cápsula e porinas).

Ayres et al (2008) realizaram um estudo para avaliar a atividade antimicrobiana da *Q. Grandiflora* (*Q. grandiflora*) contra as seguintes bactérias: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* e *Stenotrophomonas maltophilia*. Os perfis de susceptibilidade foram avaliados através de testes de difusão em meios sólidos com extrato de *Q. grandiflora*, por 24h a 35°C. As cepas que apresentaram halos de inibição iguais ou maiores que 9 mm foram submetidas ao teste de microdiluição em placas 96 poços, para determinação da CIM. Os extratos etanólicos das folhas de *Q. grandiflora* não apresentaram efeito sobre as bactérias gram-negativas estudadas, mas demonstraram atividade inibitória sobre bactérias gram-positivas, principalmente sobre *S. aureus*, para o qual a CIM foi de 1 mg/ml. Este resultado foi promissor pois este microrganismo é altamente resistente aos antibióticos, sendo a Vancomicina o melhor tratamento, que apresenta significativa toxicidade e exige monitoramento médico em sua administração (SOARES et al., 2000). Apesar de alguns estudos terem sido realizados com a *Q. grandiflora*, não há nada na literatura sobre o seu efeito contra microrganismos relacionados à cárie dentária.

Um estudo *in vitro* sobre a atividade antimicrobiana das tinturas de malva, sálvia, camomila, tomilho, cacau e própolis sobre *S. mutans* e *S. sobrinus* concluiu que a malva, sálvia e camomila não apresentam ação inibitória sobre a proliferação bacteriana. As CIMs para *S. mutans* foram de 0,06 mg/ml de tomilho; 0,10 mg/ml para o cacau, e 0,04 mg/ml para o própolis. Para *S. sobrinus*, as CIMs foram de 0,04, 0,12 e 0,02 mg/ml para tomilho, cacau e própolis, respectivamente. A seguir, foi analisada a capacidade da inibição de síntese de

glicano, representada pela aderência ao vidro. As Concentrações Inibitórias Mínimas de Aderência (CIMA) para *S. mutans* e *S. sobrinus* foram de 0,02, 0,04 e 0,01 mg/ml, respectivamente para tomilho, cacau e própolis. Os resultados sugerem a possibilidade de emprego desses agentes no controle desses microrganismos no biofilme (GEBARA et al., 1996). Em 2007, Ciancio citou em seu trabalho que a associação desses 3 agentes naturais tem sido testada (como óleo essencial-OE) e os derivados fenólicos delas misturados com salicilato de metila, mostrando que possuem seu mecanismo de ação relacionado à alteração da parede celular bacteriana, porém com baixa substantividade e com o efeito adverso de sensação de queimação durante o uso.

Prunus mume (ameixa chinesa) é uma fruta comum na Ásia. O seu extrato bruto foi testado contra culturas de *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus* e *L. acidophilus* utilizando método de difusão em ágar, para descobrir a CIM e CBM. O extrato deste fruto induziu zonas de inibição para todas as bactérias comparáveis a 0,2% de clorexidina e os valores de CIM e CBM variaram entre 0,078-0,05 g/ml. *Prunus mume* tem efeito antibacteriano, porém mais pesquisas são necessárias para elucidar os mecanismos de sua atividade contra as bactérias orais e eventuais efeitos colaterais em função das concentrações testadas (SENEVIRATNE et al., 2011).

Phytolacca americana é aplicada para tratamento de inchaço e inflamação glandular, dor óssea sífilítica, dor de garganta, amigdalite e difteria; também tem efeito antimicrobiano, anti-inflamatório e anticancerígeno (RAVIKIRAN et al., 2011). Patra et al. (2014) avaliaram o efeito antimicrobiano do extrato bruto e das frações (acetato de etila, butanol, clorofórmio e hexano) de *Phytolacca americana* (0,008-1,8 mg/ml) e compostos (Kaempferol, Quercetina, Quercetina 3-glicosídeo, Isoqueritrina e ácido Ferulico 1-8 µg/ml) de *Phytolacca americana* contra *S. mutans*. *P. americana* inibiu 44% de crescimento bacteriano com uma concentração de extrato bruto de 1,8 mg/ml. As frações de hexano e clorofórmio (ambas a 0,2 mg/ml) inibiram 62% e 56% de crescimento bacteriano, respectivamente, enquanto as outras frações não inibiram o crescimento de *S. mutans*. Apenas o kaempferol apresentou um elevado efeito antibacteriano contra *S. mutans* induzindo 97% e 45% de inibição do crescimento a 8 µg/ml e 4 µg/ml, respectivamente.

A planta de *Croton nepetaefolius* é aplicada para o tratamento de câncer, constipação, diabetes, distúrbios digestivos, disenteria, feridas externas, febre, hipercolesterolemia, hipertensão, inflamação, vermes intestinais, malária, dor, úlceras e perda de peso

(SALATINO et al., 2007). A fração específica desta planta chamada Casbane diterpene é um diterpeno com alta atividade anticancerígena e antibacteriana. As frações (hexano/etanol+ácido acético) foram avaliadas contra *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mitis*, *S. sanguinis* e *S. oralis* na forma planctônica, utilizando o método de difusão em disco. *S. mutans* também foi testado em biofilme, usando o método de cristal violeta e contagem de UFC. A CIM para *S. oralis* foi de 62,5 µg/ml e para as outras bactérias os valores estavam entre 125 e 500 µg/ml. A CBM para *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mitis* e *S. sanguinis* foi de 500 µg/ml, enquanto que apenas contra *S. oralis* a CBM foi de 125 µg/ml. A fração testada teve também um efeito inibidor na formação de biofilme de *S. mutans* a 250 µg/ml, diminuindo a viabilidade celular em 94,28%, de forma semelhante ao controle positivo (250 µg/ml de clorexidina), com um efeito anticárie promissor (SÁ et al., 2012).

Galvão et al. (2012) realizaram um estudo para avaliar atividade antiproliferativa dos óleos essenciais (OE): *Aloysia gratissima*, *Baccharis dracunculifolia*, *Coriandrum sativum* (coentro), *Lippia sidoides* e suas frações (Ag₄, Bd₂, Cs₄ e Ls₃), contra *S. mutans* na fase planctônica e avaliar as frações contra biofilme de *S. mutans*. Foram determinadas a CIM, através de diluições em microplacas de 96 poços, e a CBM em meio BHI suplementado com 5% de sangue de carneiro. Foram utilizados como controle positivo a CHX 0,12% e como controle negativo, glicol propileno 6,25%. Para os OEs contra forma planctônica, os valores de CIM e CBM obtidos, respectivamente, foram: *A. gratissima* (125 µg/ml, 250 µg/ml), *B. dracunculifolia* (62,5 µg/ml, 250 µg/ml), *C. sativum* (31,2 µg/ml, 62,5 µg/ml) e *L. sidoides* (62,5 µg/ml, 125 µg/ml). Para as frações dos OEs, os resultados de CIM e CBM foram, respectivamente: Ag₄ (31,2 µg/ml, 62,5 µg/ml), Bd₂ (15,6 µg/ml, 31,2 µg/ml), Cs₄ (15,6 µg/ml, 31,2 µg/ml) e Ls₃ (62,5 µg/ml, 125 µg/ml). Os OEs foram considerados como bactericidas quando a proporção do CBM:CIM esteve entre 1:1 e 2:1 e bacteriostáticos quando a proporção foi mais alta que 2:1. Portanto, a maioria dos OEs foram bactericidas, exceto *B. dracunculifolia* que obteve a proporção 4:1, apresentando efeito bacteriostático contra *S. mutans*. Para avaliar o biofilme, as amostras (com diluições variando de 7,81 a 1000 µg/ml) foram colocadas em placas de poços de poliestireno estéril, previamente tratadas com saliva. *S. mutans* foram adicionados nos poços contendo BHI com sacarose 2% e incubados a 37°C por 18 h. O crescimento do biofilme foi revelado utilizando cristal violeta e quantificado em absorbância de 575 nm. Após 18 h, o meio foi aspirado, as células foram removidas, os poços lavados 3 vezes com água destilada estéril, as placas foram colocadas para secar por 45 min antes de realizar a quantificação do biofilme por densidade óptica a 575 nm. Em relação

às frações contra biofilme, a maioria foi considerada bactericida, porém as frações Ag₄ e Bd₂ foram consideradas bacteriostática contra *S. mutans*. Os autores concluíram que todos os OEs e suas frações testadas mostraram boa atividade antimicrobiana em baixas concentrações. As frações selecionadas foram capazes de romper a formação do biofilme *S. mutans*.

Spratt et al. (2012) testaram o extrato bruto do chá verde e preto (*Camellia sinensis*), o suco de cranberry (*Vaccinium macrocarpon*), a cerveja, a framboesa (*Rubus idaeus*), a chicória (*Cichorium intybus*, Var. *sylvestris*) e os cogumelos Shiitake (*Lentinula edodes*) contra biofilmes cariogênicos (*S. sanguinis*, *S. mutans*, *S. mutans* com sacarose, *L. casei*, *V. dispar* e *N. subflava*) a 2x, 1x, 0,5x e 0,25x das concentrações de ervas. Na concentração de 1x, todos os compostos foram eficazes na inibição da formação de biofilme *in vitro*, sendo que o composto mais ativo foi framboesa (81 a 100%) e menos ativo foi chicória (0%). Todos os extratos tiveram interferência na coagregação, mas a cranberry teve o melhor efeito inibitório. A indução de desprendimento de espécies associadas à cárie (*S. mutans* e *L. casei*) e *S. sanguinis* da hidroxiapatita foi encontrada especialmente para o cogumelo. A CIM dos extratos foi calculada tanto para *S. mutans* como para *L. casei*. O chá verde apresentou a menor CIM no caso de ambas as bactérias, enquanto a maior CIM foi encontrada para chicória e cranberry no caso de *S. mutans*. Para a interrupção de biofilmes preexistentes dos organismos-alvo, todos os extratos foram capazes de interromper biofilmes de ambos os organismos-alvo, mas a chicória, cogumelo, cerveja, chá preto e framboesa foram mais ativos, mostrando entre 30% e 75% de ruptura de biofilmes (*L. casei* e *S. mutans*). O cogumelo foi responsável pela interrupção da transdução de sinal do *S. mutans*, inibindo a expressão gênica (87% a 21% do controle). As frações de baixo peso molecular (LMM) de cogumelos e framboesas, mas não de chicória, foram capazes de inibir a formação de biofilmes por *S. mutans* (99% e 32%, respectivamente). Portanto, os extratos de framboesa, chá verde e cogumelo mostraram promissor efeito antimicrobiano, mas nenhum deles afetou a produção de ácido.

Brighenti et al. (2012) analisaram o efeito do extrato de folhas de *Psidium cattleianum* aquosa (100g/600 ml) contra a formação de biofilme sobre o esmalte de dentes bovinos durante 14 dias *in situ*. Estes autores observaram uma redução na quantidade de microrganismos e polissacarídeos extracelulares e na desmineralização do esmalte quando o extrato foi aplicado em comparação ao controle negativo (água). Houve uma diminuição significativa de *Streptococcus* totais e *S. mutans* para o biofilme tratado com o extrato

comparado ao controle positivo (Listerine Antiséptico originalTM), porém sem diferença na queda do pH do biofilme entre estes dois agentes. A utilização do extrato mostrou promissor efeito antimicrobiano e anticariogênico.

Mesmo com os avanços na pesquisa e aplicação de óleos essenciais, Sienkiewicz et al. (2012) relataram que há poucos estudos avaliando seu uso para o controle de biofilme, como alternativa aos agentes sintéticos. Os óleos essenciais de 20 plantas e suas frações (*Aloysia gratissima*, *Aloysia triphylla*, *Alpinia speciosa*, *Baccharis dracunculifolia* DC, *Cinnamomum zeilanicus* Blume, *Coriandrum sativum* L., *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon martini*, *Cyperus articulatus* L., *Elyonurus muticus* Spreng., *Eugenia florida* DC., *Eugenia uniflora* L., *Lippia alba*, *L. sidoides* Cham., *Mentha piperita* L., *Mikania glomerata* Spreng., *Siparuna guianenses* Aubl., *Syzygium aromaticum* L. e *Ziziphus joazeiro* Mart.) foram testados contra *S. sanguis* e *S. mitis* em relação à CIM, CBM e formação de biofilme. Os extratos foram testados em concentrações que variam de 0,00048 a 1,0 mg/ml e comparados à clorexidina a 0,12%. Apenas óleos essenciais com os menores valores de CIM (*A. gratissima*, *C. sativum*, *C. articulatus*, *M. glomerata* e *L. sidoides*) foram selecionados e divididos em frações quimicamente semelhantes denominadas F1, F2, F3 e F4. Todas as frações apresentaram resultados semelhantes aos dos extratos brutos de óleos essenciais. Os extratos dos óleos de *C. sativum* e *M. glomerata* a 0,062 mg/ml inibiram *S. mitis* e *S. sanguis*, respectivamente, e a CBM foi de 0,125 mg/ml, valor inferior ao dos outros óleos. A fração F4 (*A. gratissima*) apresentou CIM e CBM de 0,125 mg/ml contra *S. mitis* e *S. sanguis* e a fração F2 (*L. sidoides*) apresentou CIM de 0,125 mg/ml e CBM de 0,250 mg/ml contra *S. sanguis*, enquanto que para *S. mitis* a CIM e CBM foram 0,125 mg/ml. Os extratos de *C. articulatus*, *L. sidoides* e *A. gratissima* e a fração F2 (*L. sidoides*) inibiram todas as espécies com os menores valores de CIM e CBM, quando testadas contra biofilmes de 72 h. Com relação à formação de biofilmes, os óleos essenciais de *C. articulatus* (ricos em terpenos e monoterpenos), quando testados em uma concentração de 1 mg/ml, apresentaram a melhor atividade antimicrobiana, inibindo 64% de biofilme de *S. sanguis* e 9% de *S. mitis*. As imagens de microscopia eletrônica de varredura mostraram redução da formação de biofilme e alterações na estrutura do biofilme para todos os óleos essenciais. O óleo essencial de *C. articulatus* mostrou a melhor inibição da adesão bacteriana e, conseqüentemente, da formação do biofilme. Em conclusão, os óleos essenciais testados podem ser considerados como novas fontes de agentes antibacterianos (BERSAN et al., 2014).

Araghizadeh et al. (2013) testaram o efeito do chá verde contra *S. mutans* coletados diretamente de lesões cáries *in vivo*. O extrato aquoso foi testado nas diluições de 50 a 1,56 mg/ml utilizando o método de difusão em disco. Em relação à CIM, os autores obtiveram 100% de *S. mutans* sensíveis ao extrato nas concentrações de 6,25, 12,5, 25 e 50 mg/ml produzindo uma zona de inibição de 10 a 38 mm. A maior zona de inibição foi encontrada para a diluição de 50 mg/ml (36,3 mm) em comparação ao controle positivo vancomicina (17 mm). Em relação à CIM, os valores foram de 3,28 mg/ml para o chá verde e 30 µg/ml para a vancomicina. Eles concluíram que o extrato de chá verde pode ser eficiente contra *S. mutans* e poderia ser incorporado em enxaguatórios bucais para prevenção da cárie dentária.

Signoretto et al. (2013) testaram a fração de baixa massa molecular dos extratos aquosos em concentrações de 1x e 2x para Shiitake e de 2x e 6x para a Chicória contra *S. mutans* (cultura planctônica, 10^7 /ml). A fração de 2x extrato de cogumelo foi capaz de inibir a divisão celular causando um efeito bacteriostático em comparação com o controle não tratado. Apenas a fração do extrato de chicória 6x foi capaz de inibir a divisão celular mas não exercer efeito bactericida. Foi observado um forte efeito inibidor na síntese de DNA, com síntese residual inferior a 10%, enquanto a síntese de RNA foi reduzida para cerca de 20% do controle durante o tratamento com concentração 2x ou 6x de extratos de cogumelos e chicória, respectivamente. Nas mesmas concentrações, a síntese proteica foi inibida em 50%. A análise proteômica de membrana e do citosol foi feita apenas para extrato de cogumelo (fração de baixa massa molecular) em comparação com *S. mutans* não tratado. Os autores observaram alterações em 31 proteínas de membrana e 20 proteínas de citosol. Portanto, a incorporação dos extratos de cogumelos e chicória em dentifrícios e enxaguatórios podem ser interessantes para a prevenção de cárie.

Citrus sinensis é uma das maiores e mais importantes representantes dos frutos cítricos. Árvores de laranja são amplamente cultivadas em climas tropicais e subtropicais para suco e valores medicinais (SHAKTHI et al., 2014). Muitas propriedades medicinais do extrato da casca da laranja são relatadas como o combate à cólica, dor de estômago, câncer, como diurético, também utilizado no tratamento e prevenção de deficiência de vitaminas, resfriado, gripe e ajuda no combate a infecções virais e bacterianas (GROSSO et al., 2013). Shetty et al. (2016) realizaram experimentos com extrato da casca desta planta (diluídos em água ou etanol, quente ou frio) contra *S. mutans* e *L. acidophylus* determinando a CIM. Como resultado, observaram que o extrato etanólico quente mostrou maior zona de inibição

comparado ao extrato etanólico frio contra as bactérias citadas. Os extratos diluídos em água quente e fria inibiram o crescimento em concentrações mais altas de 34,9 e 32 mg/ml contra *S. mutans*, respectivamente. A CIM do extrato etanólico quente e frio da casca da laranja ficou entre 12-15 mg/ml contra ambas bactérias do estudo. Portanto, concluíram que os extratos etanólicos mostraram melhor atividade antimicrobiana do que os extratos aquosos e os extratos quentes apresentaram maior efetividade do que os frios.

Os extratos de folha de oliveira (solvente: acetona), azeitona (etanol), goma de mascar (acetato de etila com metanol) e *Inula viscosa* (acetato de etila e metanol) foram testados contra bactérias orais como *S. mutans*, *S. sobrinus* e *S. oralis* em concentrações de 0,02 a 10 mg/ml. O melhor valor de CIM foi encontrado para o extrato de folha de oliveira (0,07 mg/ml) contra *S. oralis*, no entanto, a CBM não foi encontrada. Para a azeitona, a CIM encontrada contra *S. oralis* e *S. mutans* foi de 1,25 mg/ml e a CBM foi encontrada apenas contra *S. oralis* (2,50 mg/ml). O valor de CIM de *I. viscosa* (extrato de acetato de etila) foi de 0,15 mg/ml contra *S. mutans* (CBM: 1,25 mg/ml) e 0,30 mg/ml contra *S. oralis* (CBM: 0,30 mg/ml). A CIM de *I. viscosa* (extrato metanólico) e goma de mascar foi de 0,60 mg/ml (CBM: 0,60 mg/ml) e 2,50 mg/ml (CBM: 5 mg/ml) contra *S. oralis*, respectivamente. Nenhuma atividade foi observada contra *S. mutans* e *S. sobrinus* para *I. viscosa* (extrato metanólico) e goma de mascar. *I. viscosa* (extrato de acetato de etila) e extrato de folha de oliveira mostraram a melhor atividade antimicrobiana contra microrganismos bucais. Portanto, podem ser considerados como um método alternativo no controle da cárie dentária (KARYGIANNI et al., 2014).

Ainda em 2014, Mistry et al. realizaram um estudo *in vitro* para avaliar a atividade antimicrobiana do extratos hidroalcoólicos de *Azadirachta indica* (Neem), *Ocimum sanctum* (Tulsi), *Mimusops elengi* (Bakul), *Tinospora cardifolia* (Giloy) e CHX contra *S. mutans*, *E. faecalis* e *S. aureus*. A determinação da CIM foi realizada através de diluições seriadas (3 mg a 125 µg) em micro-placas e a CBM foi determinada pela leitura da zona de inibição de crescimento bacteriano, em placas de petri. A CIM do extrato de *A. indica* foi de 125 µg/ml contra *S. mutans* (CBM: 250 µg/ml), 500 µg/ml contra *E. Faecalis* (CBM: 1 mg/ml) e 250 µg/ml contra *S. aureus* (CBM: 500 µg/ml). A CIM do extrato de *O. sanctum* foi 125 µg/ml contra *S. mutans* (CBM: 250 µg/ml), 1 mg/ml contra *E. faecalis* (CBM: 2 mg/ml) e 250 µg/ml contra *S. aureus* (CBM: 500 µg/ml). Para o extrato de *T. cardifolia* contra *S. mutans*, *E. faecalis* e *S. aureus* a CIM foi de 250 µg/ml (CBM: 500 µg/ml). A CIM do *M. elengi* foi de

500 µg/ml contra *S. mutans*, *E. faecalis* e *S. aureus* (CBM: 1 mg/ml). Em relação à CHX, os autores sugeriram a CIM <0,0625% baseados no valor da CBM 0,0625% contra os 3 microrganismos testados. Concluíram que todos os extratos das plantas estudadas e a CHX mostraram considerável atividade antimicrobiana contra microrganismos estudados.

Jain et al. (2015) descreveram a susceptibilidade de *S. mutans* (isolados das amostras de biofilme de 45 pacientes pediátricos) ao extrato bruto, aquoso ou orgânico (clorofórmio, acetona e etanol) das folhas de Aloe vera, Amla, alho, rizomas de gengibre, Neem e Tulsi avaliados pelo método de difusão no ágar. Os tratamentos que apresentaram efeito antimicrobiano comparável à clorexidina 0,2% (zona de inibição = 20 mm) foram: o extrato orgânico de Aloe vera (14,89 mm), Ginger (17,58 mm) e Tulsis (16,53 mm); extratos aquosos de Amla (17,96 mm) e Neem (16,67 mm) e o extrato bruto de alho (20,87 mm). De acordo com Lee (2001), o alho tem mostrado propriedade antibacteriana, antifúngica e antiviral assim como efeito antibacteriano contra *S. mutans*. Hasan et al. (2012) também testaram o efeito do extrato bruto e etanólico de *Emblica officinalis* (Amla) (concentrações de 2,44 a 5000 µg/ml) contra *S. mutans*. Os valores de CIM foram de 625 µg/ml (extrato bruto) e 1250 µg/ml (fracção etanólica). Os extratos bruto e etanólico mostraram uma redução de 50% na aderência a concentrações de 156 µg/ml e 312,5 µg/ml, respectivamente. O biofilme foi reduzido em 50% na presença de extrato bruto (39,04 µg/ml) e da fração etanólica (78,08 µg/ml). A redução eficaz foi observada na síntese de glicano e na hidrofobicidade da superfície celular. A qRT-PCR revelou supressão significativa de genes envolvidos na virulência (smu0630, com DE, gtf C, vic R e gbp B). As microscopias confocal e de varredura eletrônica mostraram claramente uma redução da estrutura do biofilme. Portanto, Amla mostrou efeito antibacteriano sobre o biofilme.

Swadas et al. (2016) realizaram um estudo avaliando e comparando a atividade antibacteriana de diferentes concentrações do extrato da semente de uva com CHX a 2% contra *S. mutans*. Foram preparadas diluições do extrato nas concentrações 500, 250 e 125 mg/ml em água. A água ultrapura foi utilizada como controle negativo e CHX como controle positivo, totalizando 5 grupos experimentais. A cepa *S. mutans* foi inoculada no ágar MSB (meio ágar Mitis salivarius bacitracina) para contagem de UFC a 37°C por 48 h. Como resultado as diferentes concentrações do extrato da semente de uva citadas acima foram significativamente menos efetivas que a CHX a 2%. Na concentração de 500 mg/ml o efeito antibacteriano foi significativamente maior que na concentração 125 mg/ml do extrato da

semente de uva. Concluíram que o extrato de semente de uva, apesar de apresentar um efeito antibacteriano em concentrações mais altas, não foi muito efetivo como agente antimicrobiano comparado à CHX.

Baccharis dracunculifolia (Asteraceae) é uma planta nativa do Brasil, utilizada na medicina como antifebril, anti-inflamatório, antisséptico, no tratamento de ferida de pele e doenças gastrointestinais (PARREIRA et al., 2010). OE desta planta tem atividade bacteriostática *in vitro* rompendo biofilme em concentrações abaixo de 31,25 µg/ml (GALVÃO et al., 2012). Pedrazzi et al. (2015) compararam um bochecho contendo 0,04% de óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. com dois enxaguatórios bucais comerciais (Colgate Plax e Listerine) em relação à redução do biofilme em 12 pacientes. Após duas semanas, o índice de placa foi medido e a quantidade de biofilme dos pacientes que aplicaram o enxaguatório bucal experimental foi semelhante à quantidade de pacientes que aplicaram os enxaguatórios bucais comerciais. Os autores concluíram que não houve diferença significativa entre os produtos utilizados no estudo, provando o bom efeito da *Baccharis dracunculifolia* no controle do biofilme dentário.

Hajifattahi et al. (2016) realizaram um estudo *in vitro* para avaliar o efeito do extrato hidroalcóolico da pétala de *Punica granatum* Linn. contra *S. sanguinis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sobrinus* e *E. faecalis*. Foram avaliados os efeitos antibacterianos dos extratos, da CHX e da ampicilina através do método de diluições seriadas em microplacas. A CIM e a CBM foram avaliadas através do diâmetro de inibição de crescimento. Como resultado, os autores obtiveram CIM do extrato de 3,9 mg/ml para *S. mutans* (CBM: 3,9 mg/ml), 7,81 mg/ml para *S. sanguinis* (CBM: 31,25 mg/ml), 31,25 mg/ml para *S. salivarius* (CBM: 62,5 mg/ml), 7,81 mg/ml para *S. sobrinus* (CBM: 31,25 mg/ml) e 125 mg/ml para *E. faecalis* (CBM: 250 mg/ml). Quanto à CIM da CHX, os resultados foram de 0,09 mg/ml para *S. mutans* (CBM: 0,09 mg/ml), 0,02 mg/ml para *S. sanguinis* (CBM: 0,012 mg/ml), 0,78 mg/ml para *S. salivarius* (CBM: 0,39%), 0,04 mg/ml para *S. sobrinus* (CBM: 0,02) e 6,25 mg/ml para *E. faecalis* (CBM: 3.125 mg/ml). A CIM da Ampicilina foi 0,06 mg/ml para *S. mutans* (CBM: 0,125), 0,015 mg/ml para *S. sanguinis* (CBM: 0,03), 0,125 mg/ml para *S. salivarius* (CBM: 0,125), 0,125 mg/ml para *S. sobrinus* (CBM: 0,25 mg/ml) e 2 mg/ml para *E. faecalis* (CBM: 4 mg/ml). Os autores concluíram que o extrato de *P. granatum* apresentou um significativo efeito antibacteriano sobre bactérias bucais com máximo efeito contra *S. mutans*, o qual é o principal microrganismo responsável pelo desenvolvimento da cárie dentária.

Motamedifar et al. (2016) demonstraram a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico de *Peganum Harmala* L. e da CHX 0,2% contra *S. mutans*. O estudo foi realizado através de diluições seriadas do extrato (50 a 3,125 mg/ml) para determinação da CIM e a CBM em placas de ágar sangue. A CIM do extrato contra *S. mutans* foi $1,83 \pm 0,6$ mg/ml e a CBM foi $4,3 \pm 1,0$ mg/ml. As CIM e CBM para CHX foram 0,19 mg/ml e 0,78 mg/ml, respectivamente. Os autores concluíram que o extrato em questão pode inibir o crescimento de *S. mutans*. Entretanto, a alta toxicidade celular deste extrato limita o uso desta planta como agente antimicrobiano (enxaguatório) na cavidade bucal.

Ainda em 2016, Shekar et al. realizaram um estudo *in vitro* avaliando a eficácia dos extratos etanólicos das folhas de *Acacia nilótica*, *Murraya koenigii* (L.) Sprengel, *Eucalyptus hybrid*, *Psidium guajava* e suas combinações contra *S. mutans* e *L. acidophilus*. Como controle positivo foi utilizada CHX 0,2%, e sulfóxido dimetil (DMSO) foi utilizado para assegurar morte total de bactérias. Todos os extratos de plantas e suas combinações inibiram crescimento de *S. mutans*, entretanto, a combinação dos 4 extratos produziu uma zona de inibição maior ($23,5 \pm 2,2$ mm), seguido da combinação de *A. nilótica*, *E. hybrid*, *P. guajava* ($22,3 \pm 0,6$ mm) e da CHX ($14,5 \pm 2,1$ mm). A diferença do diâmetro da zona de inibição entre as várias plantas foi estatisticamente significativa ($p=0,001$). Em relação ao *L. acidophilus* todos os extratos de plantas individuais inibiram o crescimento, sendo que a maior zona de inibição foi produzida pela *A. nilótica* ($14,1 \pm 1,8$ mm), seguida por *E. hybrid* ($13,9 \pm 1,4$ mm). Entretanto, a CHX 0,2% produziu o maior halo de inibição ($18,8 \pm 1,2$ mm) comparado com todos os extratos individuais ($p<0,001$). Todos os extratos foram efetivos contra *S. mutans* e *L. acidophilus* e poderiam ser testados como alternativas à CHX, entretanto, estas plantas devem ser avaliadas em relação à citotoxicidade utilizando modelos animais, assim como o efeito antimicrobiano deve ser comprovado utilizando estudos clínicos.

Peedikayil et al. (2016) avaliaram a eficácia antibacteriana do óleo de coco comparado à CHX contra *S. mutans*, envolvendo 50 crianças (8-12 anos) do gênero feminino, sendo 25 crianças distribuídas em cada grupo: grupo de estudo (óleo de coco) e o grupo controle (CHX). Os participantes foram instruídos a bochechar óleo de coco (grupo estudo) ou CHX (grupo controle) diariamente pela manhã, após a escovação, por 2-3 minutos. As coletas de *S. mutans* do biofilme e da saliva foram realizadas nos dias 1, 15 e 30, através de fitas Dentocult SM *mutans* da Orion Diagnóstica (ESPO, Finlândia) e depois transferidas para um meio de

cultura seletivo a 37°C por 48 h. O biofilme tratado com óleo de coco apresentou diminuição significativa do nível de *S. mutans* nos dias 15 e 30 ($p<0,001$). Em relação à saliva o uso de óleo de coco também reduziu significativamente os níveis da bactéria em questão nos dias 15 e 30 ($p<0,001$). Nas amostras de biofilme tratadas com CHX, houve redução significativa de *S. mutans* nos dias 15 e 30, porém na saliva a redução de *S. mutans* foi observada apenas no dia 15 ($p<0,001$). No dia 15, o halo de inibição foi de $1,76 \pm 0,436$ mm e $1,440 \pm 0,507$ mm em biofilme para os grupos de tratamento com o óleo de coco e CHX, respectivamente ($p=0,022$); enquanto que no dia 30, não houve diferença significativa entre os grupos ($p=1,000$). Em relação à saliva no dia 15, o halo de inibição foi $1,24 \pm 0,436$ mm e $1,00 \pm 0,00$ mm para os grupos de tratamento com o óleo de coco e CHX, respectivamente ($p=0,010$); enquanto que no dia 30, não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,190$). O bochecho com óleo de coco é tão ou mais efetivo quanto o enxagatório de CHX. A combinação do efeito de emulsificação, saponificação e antimicrobiano da cadeia média de triglicérides no óleo de coco pode ter sido responsável pela redução de *S. mutans*.

Simões et al. (2016) avaliaram *in vitro* a atividade antibacteriana do gel de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) e do gel CHX 1% contra *S. mitis*, *S. constellatus* e *S. salivarius* isolados de pacientes (com idade de 21 a 35 anos, ambos os gêneros) da cidade de Manaus e contra cepas ATCC de *S. mitis*, *S. mutans*, *S. sanguinis* e *S. oralis*. O gel de CHX 1% foi utilizado como controle positivo e o gel base foi utilizado como controle negativo. As placas semeadas foram incubadas a 37°C por 12 e 24 h, para análise do halo de inibição. Nenhuma diferença foi detectada entre o gel de óleo de copaíba e CHX no período de 12 h em relação ao *S. mitis*. Para as outras bactérias, a CHX apresentou valores mais altos (19,71 a 20,86 mm) que o gel de copaíba (13,57 a 16,57 mm). Após 24 h, nenhuma diferença significativa foi observada entre os resultados obtidos com CHX e o gel de copaíba para *S. mitis* e *S. salivarius*, entretanto, para as outras bactérias, a CHX apresentou valores maiores (21,00 a 22,43 mm) que o gel de copaíba (13,42 a 16,71 mm), com diferença significativa ($p<0,05$). Os autores concluíram que o gel de óleo de copaíba e o gel de CHX 1% mostraram atividade antibacteriana similar contra alguns dos microrganismos testados.

Recentemente, Janardhanan et al. (2017) realizaram um estudo *in vitro* para avaliar a eficácia antibacteriana do extrato do pericarpo de *Garnica mangostana* (diluído em clorofórmio) contra bactérias cariogênicas. As bactérias (ATCC) testadas foram *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. oralis* e *L. acidophilus*. A CIM e CBM foram determinadas pelo

método de diluição e a CHX foi utilizada como controle positivo. Os resultados do extrato contra as bactérias foram: *S. sanguis* (CIM: 100 mg/ml e CBM: 200 mg/ml), *S. salivarius* (CIM: 100 mg/ml e CBM: 200 mg/ml), *S. oralis* (CIM: 50 mg/ml e CBM: 100 mg/ml), *S. mutans* (CIM: 100 mg/ml e CBM: 200 mg/ml) e *L. acidophilus* (CIM: 25 mg/ml e CBM: 50 mg/ml). A eficácia da CHX foi testada por halo de inibição com seguintes resultados: *S. sanguis* ($15 \pm 3,17$ mm), *S. salivarius* ($13 \pm 5,00$ mm), *S. oralis* ($13 \pm 5,00$ mm), *S. mutans* ($14 \pm 5,00$ mm), *L. acidophilus* ($14 \pm 4,67$ mm). A zona de inibição dos extratos (variaram de 3 a 11,6 mm) foi comparada com a induzida pela CHX 0,2%, onde obteve-se resultado estatisticamente diferente somente para *S. salivarius*, *S. mutans* e *S. oralis*. Os autores concluíram que o extrato clorofórmico do pericarpo da *Garnica mangostana* mostrou uma zona de inibição efetiva contra todos os microrganismos testados, mostrando atividade promissora contra patógenos bucais. Estudos mais detalhados para analisar a atividade de biocomponentes dos extratos clorofórmicos poderiam ajudar na concepção de novas drogas voltadas para a prevenção e tratamento da cárie dentária.

Apesar da existência de vários tipos de extratos de plantas, poucos são os estudos conduzidos até o momento, em especial considerando as plantas da nossa região, que poderiam ter uma aplicação como antimicrobianas. Por isto, novos estudos, utilizando metodologias mais próximas do que acontece *in vivo*, devem ser realizados. Também deve-se procurar o entendimento sobre o mecanismo de ação, o efeito direto na estrutura dentária assim como eventuais efeitos colaterais do uso contínuo dos extratos das plantas (ALVES et al., 2010).

Nosso grupo de pesquisa já vem desenvolvendo trabalhos sobre a ação das mesmas plantas em biofilme e sobre a prevenção da desmineralização do esmalte, porém sentiu-se a necessidade de se determinar a CIM e CBM dos extratos em relação às principais bactérias cariogênicas, conforme será descrito nesta tese.

3 OBJETIVO

3 OBJETIVO

3.1 Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos brutos e hidroalcoolicos das folhas de *Myracrodruon urundeuva* All. e *Qualea grandiflora* Mart sobre cepas de *S. mutans* (ATCC 21175) e *L. casei* (ATCC 334).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparação dos extratos das plantas

A coleta do material foi realizada no Parque Ecológico Municipal do Jardim Botânico de Bauru, no período correspondente ao inverno (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Foi coletado aproximadamente 1kg de folhas da *Myracrodruon urundeuva* All. (Figura 1) e *Qualea grandiflora* Mart. para o estudo (Figura 2).

Figura 1 - *Myracrodruon urundeuva* All

Figura 2 - *Qualea grandiflora* Mart

Um ramo fértil foi utilizado para identificação e herborização. A identificação, herborização e armazenamento ficaram a cargo da Profª. Dra. Anne L. Dokkedal, do Departamento de Ciências Biológicas UNESP/Bauru; a exsicata (voucher químico) foi incluída no herbário do Departamento de Ciências Biológicas (UNBA). As coletas tiveram autorização expedida pelo SISBIO sob nº 39825-1. As folhas foram lavadas em água corrente, rinsadas com água deionizada e secas em estufa a 45°C por 48 h. Em seguida, foram pulverizadas em moinho de facas, a fim de facilitar a extração de seus constituintes químicos. A extração foi feita por percolação do pó com solvente orgânico (EtOH 70%) à temperatura ambiente. Após a extração, o solvente foi concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida, em temperatura <50°C. O extrato bruto de cada planta foi finalmente liofilizado, pesado e armazenado em frasco âmbar à temperatura ambiente (SALDANHA et al., 2013) (Figura 3).

Figura 3 – Extrato de *Myracrodruon urundeuva* All

Figura 4 – Extrato de *Qualea grandiflora* Mart

4.2 Suspensão bacteriana

Foram utilizadas para este estudo cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 21175) e de *Lactobacillus casei* (ATCC 334). A amostra de *S. mutans* foi reativada em 3 ml de caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth – KASVI, Itália) e a de *L. casei* em 3 ml de caldo Rogosa (HIMEDIA, Índia), onde a turvação da suspensão foi comparada com a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml) em espectrofotômetro a 540 nm (Beckman Coulter, Alemanha) (Figura 4). Para o teste de microdiluição, foram feitas diluições para que cada poço apresentasse concentração equivalente a 5×10^5 UFC/ml (CLSI, 2012).

Figura 5 - Espectrofotômetro Beckman Coulter

4.3 Obtenção da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas de 96 poços (NEST Biotech, China) (Figura 6).

Figura 6 - Microplacas de 96 poços (Experimento em álcool da *M. urundeuva* contra *S. mutans*)

Os extratos foram diluídos em BHI e etanol 5%. Nós determinamos o valor de 5% de etanol com base em testes pilotos, nos quais foi demonstrado que esta concentração de álcool não exercia efeito antimicrobiano significativo.

Para o experimento com extratos diluídos em BHI, foram distribuídos 180 µl dos extratos diluídos em BHI suplementados com 1% de sacarose contendo *Myracrodruon urundeuva* All. ou *Qualea grandiflora* Mart. em diferentes concentrações (diluição seriada) e 20 µl de BHI contendo *S. mutans* ou *L. casei* em cada poço, totalizando 200 µl. As concentrações de extratos testadas no experimento com BHI variaram de 2 mg/ml a 0,00012207 mg/ml. Neste experimento, foram utilizados como controle positivo a clorexidina (Periogard® 0,12%, Colgate, Brasil) (1,1 mg/ml a 0,00234 mg/ml) e como controle negativo o BHI suplementado com 1% de sacarose. Os experimentos foram realizados em duplicata biológica (n=3/experimento).

Para o experimento com extratos diluídos em álcool, foram distribuídos 80 µl de caldo BHI ou Rogosa, 100 µl dos extratos hidroalcoólicos de *Myracrodruon urundeuva* All. e *Qualea grandiflora* Mart. em diferentes concentrações (diluição seriada) e 20 µl de BHI contendo *S. mutans* ou Rogosa para *L. casei* em cada poço, totalizando 200 µl. As concentrações de extratos testadas no experimento com etanol variaram de 20 mg/ml a 0,00244 mg/ml. Neste experimento, foram utilizados como controle positivo a clorexidina (Periogard® 0,12%, Colgate, Brasil) (1,1 mg/ml a 0,00234 mg/ml) e como controles negativos o BHI sem sacarose e o BHI sem sacarose com álcool a 5% para os experimentos com *S. mutans*. Para os experimentos com *L. casei*, utilizamos o mesmo controle positivo citado

acima, entretanto, para os controles negativos utilizamos o Rogosa sem sacarose e o Rogosa sem sacarose com álcool 5%. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica (n=3/experimento).

Para ambos experimentos, foi inserido um blank para cada tipo de extrato e concentração, permitindo o desconto da absorbância intrínseca à cor do meio. A absorbância foi mensurada antes e após a incubação de 24-48h (CO₂ 5%, 37° C) em leitor de microplaca (Synergy H1 microplate reader Biotek, EUA) (Figura 6) a 540 nm.

Figura 7 – Leitor de microplaca Synergy H1- Biotek

As placas de 96 poços foram incubadas por 24 h (*S. mutans*) e 48 h (*L. casei*) a 37°C em estufa com 5,0% de CO₂. A CIM foi definida como a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir 100% o crescimento microbiano em relação ao controle negativo (100% de redução nos valores de absorbância).

4.4 Obtenção da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Após a leitura das microplacas, 20 µl de cada poço (valores iguais ou acima das CIMs) foram semeados em placas de ágar contendo BHI (Brain Heart Infusion Agar – KASVI, Itália) com sacarose (KASVI, Itália) para o extrato diluído em BHI e sem sacarose para o extrato diluído em álcool, as quais foram incubadas por 24 h a 37°C em estufa com 5,0% de CO₂. As células viáveis foram contabilizadas e a CBM determinada considerando a menor concentração dos extratos capaz de impedir o crescimento bacteriano visível (Figura 7). O experimento foi realizado em triplicata biológica (n=3 para cada experimento).

Figura 8 - Placa com BHI para determinação da CBM. As letras e números representam os poços da microplaca utilizada para determinação da CIM.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Experimento com extratos diluídos em BHI

A concentração máxima de extrato que possibilitou diluição em BHI sem precipitação foi 4 mg/ml e, dentro da faixa testada (diluição seriada), não foi possível determinar a CIM e CBM para os extratos em relação as duas bactérias (Tabelas 1 a 4), isto é, estes extratos diluídos em BHI não apresentaram efeito antimicrobiano. A CHX apresentou os seguintes valores de CIM (CBM): 0,002 mg/ml (0,004-0,009 mg/ml) para *S. mutans* e de 0,0002-0,0005 mg/ml (0,004 mg/ml) para *L. casei*.

Tabela 1 - Médias de absorvância (n=3/experimento) encontradas nos dois experimentos realizados com diferentes concentrações do extrato *M. urundeuva* (BHI) contra *S. mutans*.

Concentração Extrato <i>M. urundeuva</i> (mg/ml)	Valores de absorvância (Duplicata biológica)	
2	0,895	1,083
1	0,965	0,226
0,5	0,458	-0,023
0,25	0,913	0,902
0,125	0,405	0,911
0,0625	-0,251	0,813
0,03125	0,115	0,920
0,015625	0,487	0,861
0,0078125	-0,092	0,867
0,00390625	0,335	0,909
0,001953125	0,914	-0,095
0,000976563	0,948	0,899
0,000488281	0,891	0,925
0,000244141	0,617	0,915
Concentração CHX (mg/ml)	Valores de absorvância (CIM ^a e CBM ^b)	
0,6	0,080	0,008
0,3	0,008	0,019
0,15	-0,011	-0,017
0,075	0,008	0,006
0,0375	0,012	0,012
0,01875	0,006	0,006
0,009375	0,005	0,006 ^b
0,004688	0,005 ^b	0,006
0,002344	0,009 ^a	0,025 ^a
0,001172	0,469	0,292
Controle negativo	Valores de absorvância	
BHI + <i>S. mutans</i>	0,954	0,930

Tabela 2 - Médias de absorvância (n=3/experimento) encontradas nos dois experimentos realizados com diferentes concentrações do extrato *Q. grandiflora* (BHI) contra *S. mutans*. Os valores de CBM referentes à CHX não foram similares aos outros experimentos, por isso, não foram considerados.

Concentração Extrato <i>Q. grandiflora</i> (mg/ml)	Valores de absorvância (duplicata biológica)	
2	0,798	0,860
1	0,180	0,790
0,5	0,939	0,926
0,25	0,891	0,968
0,125	0,918	0,958
0,0625	0,866	0,281
0,03125	0,932	0,982
0,015625	-0,009	0,982
0,0078125	-0,140	0,190
0,00390625	0,954	0,246
0,001953125	0,950	0,960
0,000976563	-0,231	0,994
0,000488281	0,921	0,295
0,000244141	0,965	0,983
Concentração CHX (mg/ml)	Valores de absorvância (CIM^a e CBM^b)	
0,6	0,016	0,046
0,3	0,027	-0,002
0,15	-0,029	-0,027
0,075	0,008	0,014
0,0375	0,014	0,018 ^b
0,01875	0,008	0,011
0,009375	0,007	0,010
0,004688	0,004	0,006
0,002344	0,018 ^a	0,057 ^a
0,001172	0,356	0,311
Controle negativo	Valores de absorvância	
BHI + <i>S. mutans</i>	1,023	0,947

Tabela 3 - Médias de absorvância (n=3/experimento) encontradas nos dois experimentos realizados com diferentes concentrações do extrato *M. urundeuva* (BHI) contra *L. casei*

Concentração Extrato <i>M. urundeuva</i> (mg/ml)	Valores de absorvância (duplicata biológica)	
2	0,572	0,674
1	0,488	0,592
0,5	0,398	0,536
0,25	0,382	0,548
0,125	0,410	0,527
0,0625	0,411	0,589
0,03125	0,429	0,557
0,015625	0,410	0,585
0,0078125	0,402	0,582
0,00390625	0,407	0,545
0,001953125	0,383	0,566
0,000976563	0,402	0,575
0,000488281	0,397	0,555
0,000244141	0,375	0,533
Concentração CHX (mg/ml)	Valores de absorvância (CIM ^a e CBM ^b)	
0,0375	0,002	0,003
0,01875	0,006	0,003
0,009375	0,008	0,002
0,004688	0,004 ^b	0,003
0,002344	0,004	0,003
0,001172	0,004	0,004
0,000586	0,029 ^a	0,008 ^a
0,000293	0,398	0,258
0,0001465	0,375	0,294
0,00007325	0,431	0,293
Controle negativo	Valores de absorvância	
BHI + <i>L. casei</i>	0,817	0,629

Tabela 4 - Médias de absorvância (n=3/experimento) encontradas nos dois experimentos realizados com diferentes concentrações do extrato *Q. grandiflora* (BHI) contra *L. casei*

Concentração Extrato <i>Q. grandiflora</i> (mg/ml)	Valores de absorvância (duplicata biológica)	
2	0,759	0,757
1	0,672	0,709
0,5	0,847	0,743
0,25	0,763	0,706
0,125	0,858	0,690
0,0625	0,950	0,649
0,03125	0,834	0,610
0,015625	0,411	0,581
0,0078125	0,725	0,480
0,00390625	-0,545	0,617
0,001953125	0,811	0,549
0,000976563	0,642	0,619
0,000488281	0,744	0,618
0,000244141	0,639	0,625
Concentração CHX (mg/ml)	Valores de absorvância (CIM^a e CBM^b)	
0,0375	0,005	0,003
0,01875	0,005	0,004
0,009375	-0,001	0,003
0,004688	0,004 ^b	0,003
0,002344	0,003	0,003
0,001172	0,006	0,003
0,000586	0,023	0,011
0,000293	0,004 ^a	0,048 ^{ab}
0,0001465	0,493	0,291
0,00007325	0,448	0,305
Controle negativo	Valores de absorvância	
BHI + <i>L. casei</i>	0,916	0,599

5.2 Experimento com extratos diluídos em álcool

As Tabelas 5 a 8 mostram os resultados obtidos com os extratos diluídos em álcool contra *S. mutans* e *L. casei*, em todas as replicatas (n=3/experimento).

Tabela 5 - Médias de absorbância (n=3/experimento) encontradas nos três experimentos realizados com diferentes concentrações do extrato *M. urundeuva* (álcool) contra *S. mutans*.

Concentração Extrato <i>M. urundeuva</i> (mg/ml)	Valores de absorbância (CIM ^a e CBM ^b) (triplicata biológica)		
20	-0,517	0,017 ^{a*}	-0,417
10	0,408	0,273	-1,492
5	0,024 ^b	0,364	-0,152
2,5	0,089 ^a	0,105 ^b	0,060 ^{ab}
1,25	0,175	0,252	0,187
0,625	0,411	0,605	0,457
0,312	0,506	0,578	0,540
0,156	0,481	0,593	0,008
0,078	0,489	0,605	0,521
0,039	0,490	0,631	0,407
0,0195	0,444	0,593	0,377
0,00975	0,429	0,602	0,384
0,00488	0,394	0,562	0,396
0,00244	0,428	0,568	0,416
Concentração CHX (mg/ml)	Valores de absorbância (CIM ^a e CBM ^b)		
1,1	-0,001	0,027	0,014
0,6	0,066	0,083	0,031
0,3	0,035	-0,083	0,001
0,15	0,002	-0,013	-0,019
0,075	0,006	0,004	0,005
0,0375	0,006	0,007	0,005
0,01875	0,004	0,005	0,003
0,009375	0,002 ^b	0,005 ^b	-0,051 ^b
0,0046875	0,003 ^a	0,005 ^a	-0,013
0,00234375	0,520	0,215	0,058 ^a
Controles negativos	Valores de absorbância		
BHI + <i>S. mutans</i>	0,861	0,949	0,875
Álcool 5% + BHI + <i>S. mutans</i>	0,401	0,406	0,379

* valor excluído

Tabela 6 - Médias de absorvância (n=3/experimento) encontradas nos três experimentos realizados com diferentes concentrações de extrato *Q. grandiflora* (álcool) contra *S. mutans*

Concentração Extrato <i>Q. grandiflora</i> (mg/ml)	Valores de absorvância (CIM ^a e CBM ^{b*}) (triplicata biológica)		
20	-0,182	0,312	0,200
10	0,049 ^a	0,015	-0,186
5	0,129	-0,212 ^a	-0,012 ^a
2,5	0,256	0,108	0,201
1,25	0,207	0,381	0,310
0,625	0,484	0,515	0,361
0,312	0,491	0,046	0,556
0,156	-0,119	0,571	0,519
0,078	0,446	0,572	0,422
0,039	0,414	0,603	0,390
0,0195	0,372	0,615	0,403
0,00975	0,340	0,076	0,389
0,00488	0,324	0,123	0,239
0,00244	0,339	0,588	0,262
Concentração CHX (mg/ml)	Valores de absorvância (CIM ^a e CBM ^b)		
1,1	-0,002	0,013	0,013
0,6	0,078	0,123	0,047
0,3	0,007	-0,125	0,023
0,15	-0,016	-0,040	-0,021
0,075	0,006	0,002	0,002
0,0375	0,003	0,003	0,012
0,01875	0,002	0,004	0,003
0,009375	0,004 ^b	0,008 ^b	0,002 ^b
0,0046875	0,000 ^a	0,007 ^a	-0,001
0,00234375	0,747	0,459	-0,006 ^a
Controles negativos	Valores de absorvância		
BHI + <i>S. mutans</i>	0,786	0,963	0,837
Álcool 5% + BHI + <i>S. mutans</i>	0,427	0,375	0,416

* Não foi encontrada CBM para este extrato

Tabela 7 - Médias de absorvância (n=3/experimento) encontradas nos três experimentos realizados com diferentes concentrações de extrato *M. urundeuva* (álcool) contra *L. casei*

Concentração Extrato <i>M. urundeuva</i> (mg/ml)	Valores de absorvância (CIM ^a e CBM ^b) (triplicata biológica)		
20	0,045	-0,106	-0,019
10	-0,497	0,029	0,046
5	0,054	0,067	-0,102
2,5	0,100	-0,309	-0,639
1,25	0,005	0,012	0,002
0,625	0,056 ^b	0,075	0,019
0,312	0,029	0,000 ^b	0,008 ^b
0,156	-0,002 ^a	0,027 ^a	-0,002 ^a
0,078	0,539	0,182	0,702
0,039	0,569	0,298	0,036
0,0195	0,797	0,456	0,714
0,00975	0,826	0,551	0,199
0,00488	0,885	0,590	0,985
0,00244	0,825	0,661	0,519
Concentração CHX (mg/ml)	Valores de absorvância (CIM ^a e CBM ^b)		
1,1	0,003	0,008	0,013
0,6	0,007	0,014	0,011
0,3	0,001	0,020 ^b	0,134 ^b
0,15	0,002 ^{ab}	0,009	0,078
0,075	0,220	0,007	0,013
0,0375	1,058	0,007	0,011
0,01875	1,310	0,000	0,001
0,009375	1,221	0,002	0,009
0,0046875	1,360	0,068 ^a	0,012 ^a
0,00234375	1,256	0,277	1,140
Controles negativos	Valores de absorvância		
Rogosa + <i>L. casei</i>	1,129	0,619	0,996
Álcool 5% + Rogosa + <i>L. casei</i>	0,814	0,558	0,686

Tabela 8 - Médias de absorvância (n=3/experimento) encontradas nos três experimentos realizados com diferentes concentrações de extrato *Q. grandiflora* (álcool) contra *L. casei*.

Concentração Extrato <i>Q. grandiflora</i> (mg/ml)	Valores de absorvância (CIM ^a e CBM ^b) (triplicata biológica)		
20	0,150	-0,038	0,263
10	-0,269	-0,356	0,291
5	-0,011	-0,002	0,276
2,5	-0,115	-0,053	0,009
1,25	-0,041	0,045	0,086
0,625	0,000 ^a	0,051 ^{ab}	0,033
0,312	0,172 ^b	0,113	0,095 ^b
0,156	0,174	0,197	0,085 ^a
0,078	0,180	0,339	0,307
0,039	0,215	0,373	0,281
0,0195	0,316	0,493	0,778
0,00975	0,405	0,492	0,682
0,00488	0,468	0,524	0,158
0,00244	0,438	0,547	0,336
Concentração CHX (mg/ml)	Valores de absorvância (CIM ^a e CBM ^b)		
1,1	0,011	0,011	0,014
0,6	0,003	0,037	0,017
0,3	0,004 ^b	0,016 ^b	0,094 ^b
0,15	-0,001	0,017	-0,022
0,075	-0,003	0,045	0,009
0,0375	0,005	0,023	0,020
0,01875	0,003	0,004	0,033
0,009375	0,006	0,001	0,002
0,0046875	0,025	0,029 ^a	0,019 ^a
0,00234375	0,089 ^a	0,207	0,994
Controles negativos	Valores de absorvância		
Rogosa + <i>L. casei</i>	0,567	0,560	1,816
Álcool 5% + Rogosa + <i>L. casei</i>	0,447	0,522	0,445

A Tabela 9 mostra os resultados resumidos para CIM e CBM, apontando que *L. casei* foi mais susceptível aos extratos que *S. mutans*. *M. urundeuva* foi mais eficaz que *Q. grandiflora* sobre *S. mutans*, enquanto nenhuma diferença foi vista em relação ao *L. casei*. Nenhum dos extratos teve efeito antimicrobiano tão eficaz como a clorexidina.

Tabela 9 – Resultados da CIM e CBM dos extratos contras os microrganismos

	<i>S. mutans</i>	<i>L. casei</i>
<i>M. urundeuva</i>	CIM: 2,5 mg/ml	CIM: 0,156 mg/ml
	CBM: 2,5 mg/ml	CBM: 0,312 mg/ml
<i>Q. grandiflora</i>	CIM: 5,0 mg/ml	CIM: 0,156 – 0,625 mg/ml
	CBM: --	CBM: 0,312 – 0,625 mg/ml
CHX	CIM: 0,00468 mg/ml	CIM: 0,00468 mg/ml
	CBM: 0,00937 mg/ml	CBM: 0,3 mg/ml

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

As plantas constituem um importante recurso terapêutico em medicina, sendo que sua utilização como fitoterápico é ampla e envolve diversos fins, incluindo Odontologia. A fitoterapia faz parte do Sistema Único de Saúde, sendo possível a sua inclusão médica e odontológica (BRASIL, 2006). O Brasil possui grande potencial para desenvolvimento da fitoterapia aplicada à Odontologia, pois apresenta maior diversidade vegetal do mundo e ampla sócio-diversidade, assim como tem testado diferentes plantas com base em conhecimento popular e científico, para que estas possam ser indicadas de forma específica, na dosagem e tempo corretos, a fim de se obter o efeito terapêutico desejado e se evitar efeitos colaterais (ALBUQUERQUE e HANAZAKI, 2006).

Freires e Rosalen (2016) relataram a importância de se considerar, em pesquisas envolvendo fitoterapia, a possibilidade de resistência microbiana ao agente, toxicidade a curto e longo tempo, efeitos adversos, o custo-benefício da estratégia, a sustentabilidade da produção em grande escala, entre outros. Portanto, parece consensual que existe uma necessidade persistente de fármacos mais potentes, eficazes, de baixo custo, seguros, de boa tolerância e inclusos em formulações focadas em saúde bucal. Os mecanismos precisos de ação e eficácia dos inúmeros extratos de plantas testados permanecem desconhecidos até que mais pesquisas sejam realizadas, especialmente envolvendo tecnologias mais modernas, incluindo análises genômicas e proteômicas (FREIRES et al., 2014).

O interesse por agentes naturais e a alta prevalência de cárie em populações específicas (MARCENES et al., 2013) nos despertou o interesse em testar o efeito antimicrobiano dos extratos de *M. urundeuva* e *Q. grandiflora* contra as bactérias potencialmente cariogênicas (*S. mutans* e *L. casei*). Dentre as inúmeras plantas do Brasil, escolhemos a *M. urundeuva* e a *Q. grandiflora* pela conveniência dos extratos serem extraídos na UNESP/Bauru, isto é, são oriundos de plantas do nosso cerrado, e também por terem sido testadas no laboratório de Bioquímica pelo Prof. Dr. Rodrigo Cardoso, o qual avaliou os efeitos dos extratos etanólicos (70%) de *M. urundeuva* sobre a viabilidade de fibroblastos oriundos de gengiva humana, testando concentrações diluídas no meio Eagle's modificado por Dulbecco (DMEM) que variaram de 0,1 µg/ml a 1 mg/ml. Concentrações mais baixas (0,1 - 10 µg/ml) do extrato não afetaram a viabilidade dos fibroblastos, entretanto, concentrações

mais altas (100 µg/ml - 1 mg/ml) causaram uma diminuição na viabilidade celular dos fibroblastos (MACHADO et al., 2016a). O grupo de pesquisa também avaliou o efeito do extrato metanólico (80%) de *M. urundeuva* sobre a viabilidade celular de fibroblastos de gengiva humana, testando as mesmas concentrações citadas no estudo acima. Os autores demonstraram presença de tanino, esteroides e flavonoides no extrato metanólico de *M. urundeuva*. O extrato em questão foi capaz de modular a viabilidade dos fibroblastos de gengiva humana de acordo com as concentrações, reduzindo a viabilidade em altas concentrações (100 µg/ml - 1 mg/ml) e não apresentando interferência em baixas concentrações (0,1, 1 e 10 µg/ml) (MACHADO et al., 2016b).

Os efeitos do extrato hidroalcólico (70%) das folhas de *Q. grandiflora* foram avaliados em fibroblastos de ratos (NHI3T3) e sobre a atividade na matriz metaloproteinases (MMPs), que são moléculas envolvidas com inflamação. Foram testadas as mesmas concentrações dos estudos citados acima e, os autores concluíram que, em concentrações mais altas, o extrato das folhas de *Q. grandiflora* promove redução da viabilidade celular. Em relação à MMPs, todas as concentrações testadas, exceto a de 1 µg/ml, diminuíram a atividade desta enzima (SANTESSO et al., 2016). Os efeitos do extrato hidroalcólico das folhas de *Q. grandiflora*, nas mesmas concentrações citadas acima, foram avaliados na atividade e expressão da matriz metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9). Os resultados foram os mesmos dos experimentos descritos acima, ou seja, o extrato de *Q. grandiflora* pode modular a atividade e expressão das MMPs dos fibroblastos e pré-osteoblastos (TOKUHARA et al., 2016).

Por fim, o extrato aquoso de aroeira também foi avaliado na viabilidade de fibroblastos gengivais humanos *in vitro*, nas concentrações 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 comparados ao grupo controle (sem tratamento). Após 72 e 96 h de tratamento foi avaliada a viabilidade celular pela técnica MTT e os autores concluíram que o extrato de aroeira nas diferentes concentrações não apresentou citotoxicidade, entretanto, novos estudos devem ser realizados para validá-lo em relação aos aspectos biológicos (SARTORI et al., 2011).

Portanto, estes resultados descritos acima sobre viabilidade celular apontam o papel do álcool altamente concentrado como solvente na redução da viabilidade de fibroblastos induzida pelos extratos. Portanto, acreditamos que o nosso extrato diluído em apenas 5% de etanol não causará efeitos citotóxicos em fibroblastos. No entanto, há necessidade de

comparar a citotoxicidade destes extratos a agentes antimicrobianos ou anticariogênico conhecidos como clorexidina e fluoreto. É bem provável que o efeito citotóxico seja compatível ou menor para o extrato em comparação aos agentes comumente utilizados para a prevenção da cárie dentária.

No primeiro momento, nós diluímos os extratos em BHI visando eliminar a possibilidade de utilizar álcool, que dependendo da concentração inclusa, poderia apresentar efeito antimicrobiano. A concentração máxima que utilizamos dos extratos em BHI, sem precipitação visível, foi de 2 mg/ml, porém não encontramos efeito antimicrobiano, provavelmente devido ao fato do BHI não ser o melhor solvente para os agentes ativos presentes nos extratos, os quais poderiam ter efeito antimicrobiano. Devido a este resultado insatisfatório, resolvemos adicionar álcool como solvente. Em um primeiro momento, os extratos foram diluídos em álcool 8,5% e a concentração inicial dos extratos foi de 1 mg/ml, porém sem sucesso na determinação da CIM, pois observamos que a concentração do álcool testada apresentava efeito antimicrobiano. Após vários testes, optamos pelo etanol na concentração de 5%, pois concentrações ainda mais baixas do álcool não foram capazes de solubilizar o extrato testado. Adicionalmente, o efeito antimicrobiano do álcool a 5% é mínimo quando comparado ao extrato diluído no álcool, sendo possível distinguir o efeito do extrato. A concentração máxima do extrato solúvel em álcool 5% foi de 20 mg/ml, sendo esta utilizada em nosso trabalho, a partir da qual foi possível determinar a CIM para os extratos contra as bactérias estudadas.

A determinação da CIM e CBM em nosso estudo foi realizada de acordo com Cavalheiro et al. (2016). A CIM é, em geral, a primeira técnica a ser realizada para determinar o efeito antimicrobiano de um novo agente, por ser semi-quantitativa, reproduzível e confiável (por leitura de absorbância), ser mais sensível, requerer pequeno volume de amostra e permitir registro permanente de dados (OSTROSKY et al. 2008) quando comparada ao E-test (fita plástica que contém antimicrobiano em concentrações pré-determinadas) utilizado em microbiologia clínica para determinação CIM (medição de elipse formada ao redor da fita) de antibióticos (BARIANI e MIMICA, 2010). O método E-test tem a vantagem de ser mais rápido, porém de alto custo. Por outro lado, a microdiluição em placas (CIM) possui algumas desvantagens, pois alguns microrganismos se aderem à base do poço e outros ficam em suspensão, além de alguns componentes dos extratos precipitarem e interferirem na leitura da

absorbância (ELOFF, 1998). Por isso, ter um poço blank para cada diluição é fundamental e isto foi feito em nosso trabalho.

Em relação à CBM, o método utilizado foi placas com meio ágar, selecionado por ter a vantagem de possibilitar fácil visualização das colônias (contagem das UFC). A aplicação deste método possui desvantagens, pois se limita a microrganismos de crescimento rápido (aeróbicos ou anaeróbicos facultativos) e a espessura e a uniformidade do ágar são essenciais para uma boa leitura dos resultados. Ainda o crescimento do microrganismo depende da quantidade do inóculo e das condições de incubação, que devem ser semelhantes para toda superfície da placa (PINTO et al., 2003).

Por outro lado, a metodologia para determinar a CIM e a CBM apresenta algumas limitações como o uso dos microrganismos na forma planctônica, sendo que no nosso trabalho o agente antimicrobiano permaneceu agindo por 24 h, para possibilitar o crescimento (ou não) quantificável das bactérias. Estas duas situações não ocorrem na cavidade bucal, onde os microrganismos potencialmente patogênicos estão organizados em biofilme (protegidos por uma matriz extracelular), o que torna o agente menos efetivo que o testado na fase planctônica. Adicionalmente, o agente em geral permanece por volta de 1 minuto em contato direto com o biofilme *in vivo*, durante a realização de um bochecho, por exemplo. Obviamente, se o agente tiver substantividade ainda permanecerá na cavidade bucal por algumas horas, porém em concentrações menores que a inicialmente aplicada, o que de certa forma simulamos com as diluições seriadas em nosso trabalho.

Para simular melhor o que ocorre *in vivo*, tem se testado um outro modelo *in vitro* para determinação da CIMB (concentração inibitória mínima de biofilme) através da avaliação da viabilidade das bactérias aderidas ao fundo do poço da microplaca após 24 h de tratamento pela técnica de MTT (Li et al., 2014). Para a determinação da CMEB (concentração mínima de erradicação de biofilme), as bactérias são cultivadas 24 h com meio sem tratamento, os poços são lavados com PBS e adicionam-se os extratos diretamente nos poços. Após 48 h, os tratamentos são removidos e a viabilidade das bactérias aderidas ao fundo do poço é quantificada pela técnica MTT (TEANPAISAN et al., 2014). Estes modelos *in vitro* seriam possíveis substitutos da CIM e CBM, por serem mais próximos da situação *in vivo*, entretanto, há necessidade de modelos ainda mais próximos das condições clínicas.

Em relação aos extratos, nós pesquisamos na literatura e encontramos somente o trabalho de Alves et al. (2009), que determinou a CIM da *M. urundeuva* contra *S. mutans* e *L. casei*. Os resultados destes autores foram diferentes do nosso estudo; observamos que as CIMs foram menores que as do nosso trabalho (CIMs: 0,125 mg/ml para *S. mutans* e 0,03125 mg/ml para *L. casei*). Um detalhe importante é que, tanto a metodologia adotada como a fonte do extrato foram diferentes do nosso trabalho, pois eles utilizaram o extrato da casca do caule e o método de difusão de disco por halo de inibição. Infelizmente, estes autores não citaram as cepas utilizadas. Ainda os diferentes achados podem ser justificados pela forma de colheita e extração das plantas. No entanto, ambos os trabalhos foram capazes de mostrar que *L. casei* é mais susceptível aos extratos que *S. mutans*. De acordo com a literatura, variações referentes à CIM dos extratos de plantas podem ser atribuídas à cepa utilizada no teste, à origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados das folhas secas ou frescas e quantidade do extrato testada (FENNEL et al., 2004).

Quanto à *Q. grandiflora*, foram encontrados dois trabalhos, um descrito por Ayres et al. (2008) e outro por Moura et al. (2012), porém ambos não envolveram bactérias bucais *S. mutans* e *L. casei* do nosso trabalho. Resumindo, encontramos muita dificuldade em confrontarmos nossos resultados com a literatura, pois não há muitos estudos utilizando a mesma metodologia, as mesmas cepas e a mesma fonte do extrato que utilizamos no nosso trabalho.

Todos os componentes dos extratos de *M. urundeuva* (flavonoides, terpenos, chalconas, xantonas, urundeuquina, lipídeos totais, fenólicos, ácido gálico e lectina) e de *Q. grandiflora* (taninos, catequinas, esteroides, terpenos e saponinas) são solúveis em álcool, principalmente metanol (ANVISA, 2010). Na escolha de um solvente, além dos fatores relacionados ao processo extrativo, é importante levar em consideração a toxicidade e/ou os riscos com seu manuseio, assim como a estabilidade das substâncias extraídas, a disponibilidade e o custo do solvente (SIMÕES et al., 2004). Como o metanol é considerado tóxico, optamos por utilizar o etanol em nosso estudo. Em trabalhos sobre atividade antimicrobiana de extratos brutos vegetais, seu potencial não se deve exclusivamente a um único componente mas sim ao conjunto deles. Nosso trabalho mostrou que *M. urundeuva* foi mais eficaz que *Q. grandiflora* contra *S. mutans*, porém os dois agentes são similares sobre *L. casei*. Comparando os dois extratos, notamos que a *M. urundeuva* contém mais componentes com propriedades antimicrobianas, principalmente os compostos flavonoides, chalconas,

urundeuvinas, fenólicos, ácido gálico e lectina que possuem sua ação antimicrobiana comprovada na literatura (SIMÕES et al., 2004) e que não são encontrados nos extratos de *Q. grandiflora*. Provavelmente o conjunto destes componentes potencializou a ação antimicrobiana da *M. urundeuva* principalmente contra *S. mutans*.

O uso de um extrato bruto de uma espécie vegetal, que possui efeito bactericida satisfatório sem efeitos colaterais, poderia dispensar a realização de testes com frações, reduzindo etapas químicas e custos financeiros, viabilizando uma possível utilização do extrato bruto como fitoterápico (CUNHA, 2006). Por outro lado, testes com as frações podem gerar informações importantes sobre o papel de cada componente ativo da planta. No entanto, em alguns casos os extratos fracionados podem não ter efeito antimicrobiano quando isolados em comparação ao extrato bruto (BOROS, 2007). Fatores como localização geográfica, efeito sazonal e diversidade biológica também podem ter influência sobre a composição química dos extratos (JEON et al., 2011). Portanto, os extratos devem ser produzidos em diferentes momentos e testados várias vezes para verificar o efeito destes fatores na atividade antimicrobiana.

Para discutirmos nossos resultados de CIM e CBM da CHX, vamos considerar somente os dados referentes aos experimentos em que os extratos foram diluídos em álcool. Confrontando nossos resultados com a literatura, a CIM (0,09 µg/ml) encontrada por Soares et al. (2008) foi menor que a do nosso estudo, provavelmente pela diferença das cepas testadas (*S. mutans* e *L. casei*). Estes autores adicionalmente testaram clorexidina pura enquanto nós utilizamos um produto comercial diluído (Periogard®). Solmaz e Korachi (2013) também apresentaram valores de CIM (1,5 µg/ml) e CBM (3 µg/ml) da CHX contra *S. mutans* um pouco menores que os nossos valores. Por outro lado, Balto et al. (2017) determinaram a CIM e CBM para CHX de 0,2 mg/ml contra *S. mutans*, assim como Hajifattahi et al. (2016) também encontraram valores de CIM e CBM (0,09 mg/ml) para CHX sobre *S. mutans* superiores aos nossos valores. Com base nisto, podemos inferir que a determinação da CIM é altamente influenciada pelo tipo de cepa testada e modelo de estudo, fazendo-nos refletir o quanto estas cepas podem ser representativas das bactérias presentes na cavidade bucal e sobre a necessidade de se testar os agentes em modelos mais próximos do clínico.

Nenhum dos extratos testados foi tão eficiente quanto à CHX, que é considerada padrão ouro na Odontologia. A substantividade da CHX, ou seja, seu tempo de permanência ativa na cavidade bucal é aproximadamente 12 horas, o que pode ser explicado pela sua

estrutura química. A clorexidina (porção hidrofóbica e polar positiva interagem com o biofilme) exerce uma ação bactericida imediata, combinada à atividade bacteriostática prolongada (ZANATTA e RÖSING, 2007). Entretanto, seu uso prolongado causa efeitos colaterais como manchas nos dentes e em restaurações, perda do paladar, descamação e sensação de ardência na mucosa e língua (CHARLES et al., 2004). Por isto, seu uso é limitado e todo esforço tem sido feito para a descoberta de um agente antimicrobiano que possa substituí-la. Portanto, apesar do efeito antimicrobiano não ser tão bom, os extratos podem ser bons substitutos da clorexidina se, nas concentrações eficazes (CIM), não induzirem efeito colateral.

Quanto à diferença de comportamento das bactérias do nosso estudo, observamos que o *L. casei* foi mais susceptível ao efeito do extrato *M. urundeuva*, ou seja, a CIM foi menor; fato de grande importância, pois esta bactéria é responsável pela consolidação e aumento da consistência do biofilme e, quando associada a *S. mutans*, contribui no processo de formação da cárie dentária (BONECKER et al., 2003). Encontramos dificuldades em trabalhar com *L. casei*, pois este microrganismo apresenta crescimento lento e tempo de vida curto. Inicialmente, reativamos a cepa em Caldo BHI sem sucesso. Pesquisamos na literatura e encontramos a informação que o Caldo Rogosa seria o mais indicado para trabalhar com este microrganismo e o tempo de incubação ideal seria de 48 horas, sendo necessário reativá-lo com frequência. As diferenças encontradas entre os dois microrganismos estudados (como morfologia, metabolismo, condições de atmosfera) podem sugerir susceptibilidade diferente à ação antimicrobiana dos extratos testados.

Apesar do potencial antimicrobiano dos extratos vegetais testados ser promissor, ainda ficou aquém da clorexidina. Seria interessante isolar os componentes ativos em frações assim como pensar na associação de extratos diferentes para melhorar o efeito antimicrobiano. Estes extratos devem ser testados em modelos de biofilme (monoespécie, multiespécie ou microcosmo) que sejam próximos da situação clínica (ALVES et al., 2010). Se os resultados forem promissores, justifica-se planejar estudos *in situ* e clínicos para avaliar não somente o efeito antimicrobiano, mas principalmente o efeito sobre o desenvolvimento de lesões cariosas. Vale ressaltar que, paralelamente a estes estudos, o potencial citotóxico dos extratos deve ser investigado utilizando controles apropriados para a interpretação clínica.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

A CIM e a CBM foram determinadas apenas para os extratos diluídos em álcool, com exceção da CBM para *Q. grandiflora*. Em relação aos microrganismos, o *L. casei* é mais susceptível aos efeitos dos extratos comparado ao *S. mutans*. Quanto aos extratos, a *M. urundeuva* tem melhor efeito antimicrobiano sobre *S. mutans* comparado com os efeitos da *Q. grandiflora*. Para *L. casei*, não houve diferença entre extratos. Nenhum dos extratos testados teve efeito antimicrobiano como a clorexidina.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AAS, J. A. et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 11, p. 5721-5732, 2005.
- AGUIAR, A. A. A.; SALIBA, N. A. Toothbrushing with vegetable oil: a clinical and laboratorial analysis. **Braz Oral Res**, v. 18, n. 2, p. 168-173, 2004.
- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidade e perspectiva. **Rev Bras Farmacogn**, João Pessoa, v. 16, suppl. 0, p. 678-679, 2006.
- ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. EMBRAPA-CPAC: Distrito Federal, 1998.
- ALVES, P. M. et al. Atividade antimicrobiana, antiaderente, antifúngica in vitro de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Cândida*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 2, p. 222-224, 2009.
- ALVES, T. M. A. et al. Atividade antimicrobiana de produtos fluoretados sobre bactérias formadoras d biofilme dentário: estudo in vitro. **Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr**, v. 10, n. 2, p. 209-216, 2010.
- ANITA, P. et al. In vitro antibacterial activity of *Camellia sinensis* extract against cariogenic microorganisms. **J Basic Clin Pharm**, v. 6, p. 35-39, 2014.
- ANVISA. **Farmacopéia brasileira**. 5. ed. Brasília: Editora Fiocruz, 2010.
- ARAGHIZADEH, A. et al. Inhibitory activity of green tea (*Camellia sinensis*) extract on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. **Med Princ Pract**, v. 22, n. 4, p. 368-372, 2013.
- ARTHUR, R. A. et al. A defined-multispecies microbial model for studying enamel caries development. **Caries Res**, v. 47, p. 318-324, 2013.
- ASADOORIAN, J. CDHA position paper on commercially available ober-the-counter oral rinsing products. **Canad J Dent Hyg**, v. 40, n. 4, p. 01-13, jul/aug. 2006.
-
-

ASHLEY, P. Effectiveness of chlorhexidine varnish for preventing caries uncertain. **Evid Based Dent**, v. 11, n. 4, p. 108, 2010.

ATKINSON, B.; FOWLER, H. W. The significance of microbial film in fermenters, advances in biochemical engineering. **Springer**, v. 3, p. 221-277, 1974.

AUDI, E. A. et al. Biological activity and quality control of extract and stem bark form *Stryphnodendron adstringens*. **Acta Farm Banaerense**, v. 23, p. 328-333, 2004.

AYRES, M. C. C. et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Rev Bras Farmag**, v. 18, n. 1, p. 1-10, 2008.

AZEVEDO, M. S. et al. Microcosm biofilms originating from children with different caries experience have similar cariogenicity under successive sucrose challenges. **Caries Res**, v. 45, n. 6, p. 510-517, 2011.

BALTO, H. et al. Effectiveness of *Salvadora persica* extracts against common oral pathogens. **Saudi Dental J**, v. 29, p. 1-6, 2017.

BARIANI, D. B.; MIMICA, L. M. J. Comparação entre os métodos direto e tradicional para avaliação de susceptibilidade antimicrobiana em amostras de secreção respiratória. **Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo**, v. 55, n. 2, p. 52-59, 2010.

BEHESHTI-ROUY, M. et al. The antibacterial effect of sage extract (*Salvia officinalis*) mouthwash against *Streptococcus mutans* in dental plaque: a randomized clinical trial. **Iran J Microbiol**, v. 7, n. 3, p. 173-177, 2015.

BELLIK, Y. et al. Molecular mechanism underlying anti-inflammatory and anti-allergic activities of phytochemicals: an update. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 322-353, 2012.

BERSAN, S. M. F. et al. Action of essential oils from Brazilian native and exotic medicinal species on oral biofilms. **BMC Complement Altern Med**, v. 14, p. 451-463, 2014.

BETTEGA, P. V. C. et al. Phytotherapy: from greenhouses to drugstore's bench. **Arch Oral Res**, v. 7, n. 1, p. 89-97, 2011.

BLOM, T. et al. The effect of mouthrinses on oral malodor: a systematic review. **Int J Dent Hyg**, v. 10, n. 3, p. 209-222, 2012.

BONACORSI, C. et al. Comparison of Brazilian Plants Used to Treat Gastritis on the Oxidative Burst of *Helicobacter pylori*-Stimulated Neutrophil. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

BONECKER, M. et al. Clinical histological and microbiological study of hand-excavated carious dentine in extracted permanent teeth. **SADJ**, v. 58, n. 7, p. 273-278, 2003.

BORHAN-MOJABI, K.; AZIMI, S. Antimicrobial Natural Products in Oral Health. **Microb Pathog Strateg Combat Them Sci Technol Educ**, v. 2013, p. 932-939, 2013.

BOROS, L. F. Ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de folhas da *Schinus terebenthifolius* Raddi (Aroeira). Dissertação. Mestrado – Universidade Federal do Paraná; Paraná, 2007.

BOTELHO, M. A. et al. *Lippia sidoides* and *Myracrodruon urundeuva* gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J Ethnoph**, v. 113, n. 3, p. 471-478, 2007.

BOWEN, W. H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Res**, v. 45, n. 1, p. 69-86, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2006. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2006/prt0971_03_05_2006.html. Acesso em: 26 abr. 2017.

BRIGHENTI, F. L. et al. Effect of *Psidium cattleianum* leaf extract on enamel demineralisation and dental biofilm composition in situ. **Arch Oral Biol**, v. 57, n. 8, p. 1034-1040, 2012.

BURNS, T. et al. Mechanism of killing *Streptococcus mutans* by light-activated drugs. Photochemotherapy: photodynamic therapy and other modalities. Proceedings of the Society of photo-optical instrumentation engineers. **Int Soc Optical Engineering**, v. 2625, p. 288-297, 1996.

BYUN, R. et al. Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus species* present in advanced dental caries. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 7, p. 3128-3136, 2004.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Braz J Med Biol Res**, v. 33, p. 79-89, 2000.

CAMARGO, M. T. L. A. **Medicina popular**. São Paulo: Almed, 1985.

CARLINI, E. A. et al. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). **Braz J Pharmacog**, v. 20, n. 2, p. 140-146, 2010.

CARTAXO, S. L. et al. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **J Ethnoph**, v. 131, n. 2, p. 326-342, 2010.

CAVALHEIRO, A. H. et al. Antimicrobial potential of *Casearia sylvestris* against oral bacteria. **Rev Odontol UNESP**, v. 45, n. 4, p. 214-218, 2016.

CCAUAANA-VASQUEZ, R. A.; CURY, J. A. S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. **Braz Oral Res**, v. 24, p. 135-141, 2010.

CELIK, E. U. et al. Antimicrobial activity of different disinfectants against cariogenic microorganisms. **Braz Oral Res**, v. 30, n. 1, p. 1-6, 2016.

CHARLES, C. H. et al. Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical Trial. **J Clin Periodontol**, v. 31, n. 10, p. 878-884, 2004.

CIANCIO, S. G. Improving our patients oral health: the role of a triclosan/copolymer/fluoride dentifrice. **Compend Contin Educ Dent**, v. 28, n. 4, p. 178-180, 2007.

Clinical Laboratory Standards Institute - CLSI. Methods for Dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically (CLSI). 9th Edition. Wayne: CLSI; 2012.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas**. Ministério da Agricultura/Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Rio de Janeiro, 1978.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p. 267-269, 1984.

CUNHA, L. S. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos brutos de plantas de cerrado, substâncias isoladas e derivados semi-sintéticos frente a microrganismos bucais. Dissertação. Mestrado - Universidade de Franca; Franca, 2006.

CURY, J. A. et al. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Res**, v. 34, p. 491-497, 2000.

CURY, J. A. et al. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. **Caries Res**, v. 31, p. 356-360, 1997.

DARRENE, L.; CECILE, B. Experimental models of oral biofilms developed on inert Substrates: a review of the literature. **Biomed Res Int**, v. 16, p. 1-8, 2016.

DINIZ, D. N. et al. Efeito antifúngico in vitro do extrato da folha e do caule de *Myrciaria cauliflora* Berg. sobre microrganismos orais. **Rev Odontol UNESP**, v. 39, n. 3, p. 151-156, 2010.

DIOGENES, M. J. N.; MATTOS, F. J. A. Dermatites causadas por plantas. **An Bras Dermatol**, n. 74, p. 629-634, 1999.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bactéria. **Planta Med**, v. 64, p. 711-713, 1998.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico**. 1. ed. São Paulo: Santos, 2005.

FENNEL, C. W. et al. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. **J Ethnopharmacol**, v. 94, p. 205-217, 2004.

FILOCHE, S. K. et al. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. **Oral Microbiol Immunol**, v. 22, p. 73-79, 2007.

FREIRE ALLEMÃO, F. Relatório da Seção Botânica. In Trabalhos da Comissão científica de exploração. **Laemmert**, p. 93-119, 1862.

FREIRES, I. A. et al. *Coriandrum sativum* L. (coriander) essential oil: antifungal activity and mode of action on *Candida spp.*, and molecular targets affected in human whole-geome expression. **PLOS ONE**, v. 9, p. 1-13, 2014.

FREIRES, I. A.; ROSALEN, P. L. How natural product research has contributed to oral care product development? A critical view. **Pharm Res**, v. 33, p. 1311-1317, 2016.

FU, J. et al. In vitro antifungal effect and inhibitory activity on biofilm formation of seven commercial mouthwashes. **Oral Dis**, v. 20, n. 8, p. 815-820, 2014.

GALVÃO, L. C. C. et al. Antimicrobial activity of essential oils against *Streptococcus mutans* and their antiproliferative effects. **Evid based complement Alternat Med**, v. 12, p. 1-12, 2012.

GEBARA, E. C. et al. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. **Rev Odont Univ São Paulo**, v. 10, n. 4, p. 251-256, out/dez. 1996.

GEBARA, S. S. et al. Volatile compounds of leaves and fruits of *Mangifera indica* var. coquinho (Anacardiaceae) obtained using solid phase microextraction and hydrodistillation. **Food Chem**, v. 127, n. 2, p. 689-693, 2011.

GERA M. et al. Market information system for sustainable management of medicinal plants. **Indian Forester**, v. 129, n. 1, p. 102-108, 2003.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

GROSSO, G. et al. Red Orange: experimental models and epidemiological evidence of tis benefits on human health. **Oxid Med Cell Longev**, v. 13, p.1-11, 2013.

HAJIFATTAHI, F. et al. Antibacterial effect of hydroalcoholic of *Punica granatum* Linn: petal on common oral microorganisms. **Int J Biomat**, v. 10, p.1-6, 2016.

HARA, A. T. et al. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. **Caries Res**, v. 37, n. 5, p. 339-344, 2003.

HASAN, S. et al. Efficacy of *E. officinalis* on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans*: a novel and alternative approach to suppress quorum-sensing mechanism. **PLOS ONE**, v. 7, n. 7, p. 1-12, 2012.

HAYACIBARA, M. F. et al. In vitro and in vivo effects of isolated fractions os Brazilian propolis on caries development. **J Ethnopharmacol**, v. 101, p. 110-115, 2005.

HENNE, K. et al. Analysis of bacterial activity in sound and cariogenic biofilm: a pilot in vivo study. **Caries Res**, v. 50, p. 480-488, 2016.

HERLES, S. et al. Chemostat flow cell system: na in vitro model for the evalution of antiplaque agents. **J Dent Res**, v. 73, p. 1748-1755, 1994.

HIRUMA-LIMA, C. A. et al. *Qualea grandiflora*, a Brazilian “Cerrado” medicinal plant presents an important antiulcer activity. **J Ethnopharmacol**, v. 104, n. 1-2 p. 207-214, 2006.

HU, F. et al. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **J Ethnopharmacol**, v. 100, p. 276-283, 2005.

HUANG, R. et al. Bacterial interactions in dental biofilm. **Landes Bioscience**, v. 2, n. 5, p. 435-444, 2011.

IKENO, K. et al. Effects of própolis on dental caries in rats. **Caries Res**, v. 25, n. 5, p. 347-351, 1991.

JAIN, I. et al. Use of traditional Indian plants in the inhibition of caries-causing bacteria - *Streptococcus mutans*. **Braz Dent J**, v. 26, n. 2, p. 110-115, 2015.

JAMES, P. et al. The caries-preventive effect of chlorhexidine varnish in children and adolescents: a systematic review. **Caries Res**, v. 44, n. 4, p. 333-340, 2010.

JANARDHANAN, S. et al. Antimicrobial effects of *Garnica Mangostana* on cariogenic microorganisms. **J Clin Diagn Res**, v. 11, n. 1, p. 19-22, 2017.

JEON, J. G. et al. Natural products in cares research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. **Caries Res**, v. 45, p. 243-263, 2011.

JONES, C. G. Chlorhexidine: is it still the gold standart? **Periodontol**, v. 15, p. 55-62, 1997.

JUIZ, P. J. L. et al. Uso de produtos naturais como coadjuvante no tratamento da doença periodontal. **Braz J Pharmacog**, v. 20, n. 1, p. 134-139, 2009.

KARPINSKI, T.; SZKARADKIEWICZ, A. Microbiology of dental caries. **J Biol Earth Sci**, v. 3, p. 21-24, 2013.

KARYGIANNI, L. et al. High-level antimicrobial efficacy of representative Mediterranean natural plant extracts against oral microorganisms. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

KOO, H. et al. Effects of apigenin and tt-famesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. **Oral Microbiol Immunol**, v. 17, n. 6, p. 337-343, 2002.

KOO, H. et al. Inhibition os *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. **J Ant Chem**, v. 52, p. 782-789, 2003.

LANGMEAD, L.; RAMPTON, D. S. Herbal treatment in gastrointestinal and liver disease- benefits and dangers. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 15, p. 1239-1252, 2001.

LARSEN, T.; FIEHN, N. Dental biofilm infections – an update. **APMIS**, v. 125, p. 376-384, 2017.

LARSEN, T.; FIEHN, N. Dental biofilm infections – na update. **APMIS**, v. 125, p. 376-384, 2017.

LAWRENCE, J. R. et al. Community-level assessment of the effetcs of the broad-spectrum antimicrobial chlorhexidine on the outcome of river microbial bofilm development. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, n. 11, p. 3541-3550, 2008.

LEE, S. E. et al. Fungicidal activity of pipernonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, v. 20, n. 6, p. 523-528, 2001.

LI, F. et al. Effect of salivary pellicle on antibacterial activity of novel antibacterial dental adhesives using a dental plaque microcosm biofilm model. **Dent Mater**, v. 30, n. 2, p. 182-191, 2014.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum; 2002.

MACHADO, A. C. et al. “Aroeira” (*Myracrodruon urundeuva*) metanol extract: the relationship between chemical compounds and cellular effects. **Pharm Biol**, v. 54, n. 11, 2016a.

MACHADO, A. C. et al. Viability of human gingival fibroblast (FGH) treated with ethanolic “Aroeira” extract (*Myracrodruon urundeuva* Allemão), **Braz Arch Biol Technol**, v. 59, p. 1-7, 2016b.

MACHADO, A. C.; OLIVEIRA, R. C. Medicamentos fitoterápicos na odontologia: evidências e perspectivas sobre o uso da aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão). **Rev Bras Plantas Med**, Botucatu, v. 16, n. 2, p. 283-289, 2014.

MARCENES, W. et al. Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. **J Dent Res**, v. 92, p. 592-597, 2013.

MARINHO, B. V. S.; ARAÚJO, A. C. S. Uso dos enxagatórios bucais sobre a gengivite e biofilme dental. **Int J Dent**, v. 6, n. 4, p. 124-131, 2007.

MARSH, P. D. The role of microbiology in models of dental caries. **Adv Dent Res**, v. 9, p. 244-254, 1995.

MATSUDA, A. H. et al. Thermal analysis applied to irradiated propolis. **Radiat Phys Chem**, v. 63, p. 353-355, 2002.

McCARTHY, C. et al. The indigenous oral flora of man I the newborn to the 1-year-old infant. **Arch Oral Biol**, v. 10, p. 61-70, 1965.

MENEZES, T. E. C. et al. Protective efficacy of *Psidium cattleianum* and *Myracrodruon urundeuva* aqueous extracts against caries development in rats. **Pharm Biol**, v. 48, n. 3, p. 300-305, 2010.

MISTRY, K. S. et al. The antimicrobial activity of *Azadirachta indica*, *Mimusops elengi*, *Tinospora cardifolia*, *Ocimum sanctum* and 2% chlorhexidine gluconate on common endodontic pathogens: an in vitro study. **Eur J Dent**, v. 8, n. 2, p. 172-177, apr/jun. 2014.

MOGEN, A. B. et al. Pluronics Formulated Farnesol Promotes Efficient Killing and Demonstrates Novel Interactions with Streptococcus mutans Biofilms. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1-18, 2015.

MONTEIRO, M. V. et al. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **J Ethnopharmacol**, v. 111, p. 378-382, 2006.

MOTAMEDIFAR, M. et al. Antimicrobial activity of *Peganum Harmala* L. on *Streptococcus mutans* compared to 0.2% chlorhexidine. **J Dent Shiraz Univ Med Sci**, v. 17, n. 3, p. 213-218, 2016.

MOURA, C. O. et al. Atividade antibacteriana de *Qualea grandiflora* Mart. (VOCHYSIACEAE). **BioFar**, v. 8, n. 2, p. 34-42, 2012.

NAMITA, P. et al. *Camellia sinensis* (green tea): a review. **Glob J Pharmacol**, v. 6, p. 52-59, 2012.

NARHI, T. O. et al. Saliva, salivary micro-organisms, and oral health in the home-dwelling old elderly a five-year longitudinal study. **J Dent Res**, v. 78, n. 10, p. 1640-1646, 1999.

NAWWAR, M. et al. Constitutive phenolics of *Harpephyllum caffrum* (Anacardiaceae) and their biological effects on human keratinocytes. **Fitoterapia**, v. 82, p. 1265-1271, 2011.

NOVICK, A.; SZILARD, L. Description of the chemostat. **Science**, v. 112, p. 715-716, 1950.

OKTYABRSKII, O. N.; SMIRVOVAA, G. V. Redox potential changes in bacterial cultures under stress conditions. **Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 131-142, 2012.

OKZUL, Y. et al. The anticarcinogenic effect of própolis in human lymphocytes culture. **Phytomedicine**, v. 12, p. 742-747, 2004.

OLIVEIRA, F. Q. et al. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Rev Bras Farmacog**, v. 17, n. 3, p. 466-476, 2007.

OPLUSTIL, C. P. et al. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2010. 530 p.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev Bras Farmacog**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PARREIRA, N. A. et al. Antiprotozoal, schistosomicidal and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chem Biodivers**, v. 7, p. 993-1001, 2010.

PARWANI, S. R. et al. Comparative evaluation of anti-plaque efficacy of herbal and 0,2% chlorhexidine gluconate mouthwash in a 4-day plaque re-growth study. **J Indian Soc Periodontol**, v. 17, p. 72-77, 2013.

PATRA, J. K. et al. Antibacterial effect of crude extract and metabolites of *Phytolacca americana* on pathogens responsible for periodontal inflammatory diseases and dental caries. **BMC Complement Altern Med**, v. 14, p. 343-349, 2014.

PEDRAZZI, V. et al. Herbal mouthwash containing extracts of *Baccharis dracunculifolia* as agent for the control of biofilm: Clinical evaluation in humans. **Sci World J**, v. 2015, p. 1-6, 2015.

PEEDIKAYIL, F. C. et al. Comparison of antibacterial efficacy of coconut oil and chlorexidine on *Streptococcus mutans*: an in vivo study. **J Int Soc Prev Community Dent**, v. 6, n. 5, p. 447-452, 2016.

PETERSEN, P. E. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century-the approach of the WHO Global Oral Health Programme. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 31, n. 1, p. 3-23, 2003.

PINN, G. Adverse effects associated with herbal medicine. **G Pinn Aust Fam Physician**, v. 30, p. 1070-1075, 2001.

PINTO, T. J. A. et al. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 325 p.

PITTS, N. B. et al. Dental caries. **Disease Primers**, v. 3, n. 17030, p. 1-16, 2017.

PITTS, N. B. et al. Dental caries. **Disease Primers**, v. 3, n. 17030, p. 1-16, 2017.

PRATTEN, J. et al. Characterization of in vitro oral bacterial biofilms by traditional and molecular methods. **Oral Microbiol Immunol**, v. 18, p. 45-49, 2003.

PRETTY, I. A. et al. Quantification of dental plaque in the research enviroment. **J Dent**, v. 33, p. 193-207, 2005.

PREZA, D. et al. Microarray analysis of the microflora of root caries in elderly. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 28, n. 5, p. 509-517, 2009.

QUEIROZ, C. R. A. A. et al. Caracterização dos taninos da aroeira preta (*Myracrodruon urundeuira*). **R Árvore**, v. 26, p. 493-497, 2002.

RAVIKIRAN, G. et al. *Phytolacca americana*: A Review. **Int J Res Pharma Biomed Sci**, v. 2, n. 1, p. 942-946, 2011.

ROBERTS, S. K. et al. Evaluating biofilm growth of two oral pathogens. **Lett Appl Microbiol**, v. 35, p. 552-556, 2002.

ROCHA, L. et al. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Rev Bras Farmacogn**, v. 13, p. 71-74, 2003.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento Etnobotânico de Plantas Medicinais no Domínio do Cerrado na Região do Alto Rio Grande-MG. **Ciências e Agrotecnologia**, v. 25, p. 102-123, 2001.

ROSEBURY, T. Acid production and tolerance of *Lactobacilli* from dental caries and other sources as measured by the glass electrode. **J Bacteriol**, v. 24, n. 4, p.321-334, 1932.

SA, N. C. et al. Antimicrobial and antibiofilm action of casbane diterpene from *Croton nepetaefolius* against oral bacteria. **Archives of Oral Biology**, v. 57, p. 550-555, 2012.

SALATINO, A. et al. Traditional uses, chemistry and pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). **J Braz Chem Soc**, v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.

SALDANHA, L. L. et al. Characterization of Flavonoids and Phenolic Acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS Combined with NMR. **Molecules**, v. 18, p. 8402-8416, 2013.

SAMARANAYAKE, L; MATSUBARA, V. H. Normal oral flora and the oral system. **Dental Clin N Am**, v. 61, p. 199-215, 2017.

SANTESSO, M. R. et al. Effect of *Qualea grandiflora* mart. extract on NIH3T3 fibroblasts. **J Appl Oral Sci**, Bauru, v. 24, Sp. Iss, p. 6, 2016. Abstract. Presented at 29° Congresso Odontológico de Bauru “Profº Dr. Aquira Ishikiriama”, Bauru, 18-21 de maio de 2016. Disponível em: <<http://web.fob.usp.br/biblioblog/eventos/jaosv24spissue2016.pdf>>. Acesso em: 19 abr. 2017.

SANTOS, E. B. et al. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Rev Bras Pharmacog**, v. 19, p. 321-324, 2009.

SARTORI, P. F. et al. Avaliação da influência do extrato de aroeira na viabilidade de fibroblastos gengivais humanos *in vitro*. In: 19° Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2011, Ribeirão Preto. **Anais do 19° Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP**, 2011.

SCHEIE, A. A. et al. Use of palladium touch microelectrodes under Field conditions for in vivo assessment of dental plaque pH in children. **Caries Res**, v. 26, p. 44-52, 1992.

SENEVIRATNE, C. J. et al. *Prunus mume* extract exhibits antimicrobial activity against pathogenic oral bacteria. **Int J Paediatr Dent**, v. 21, n. 4, p. 299-305, 2011.

SHAKTHI, D. A. et al. Extraction process optimization of polyphenols from Indian *Citrus sinensis* – as novel antiglycative agents in the management of diabetes mellitus. **J Diabetes Metab Disord**, v. 13, n. 11, p. 1-10, 2014.

SHEKAR, B. R. C. et al. Antimicrobial efficacy of *Acacia nilótica*, *Murraya koenigii* (L.) Sprengel, *Eucalyptus hybrid*, *Psidium guajava* extracts and their combination on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*. **Dental Res J**, v. 13, n. 2, p. 1-9, 2016.

SHETTY, S. B. et al. Antimicrobial effects of *Citrus sinensis* peel extracts against dental caries bacteria: an in vitro study. **J Clin Exp Dent**, v. 8, n. 1, p. 71-77, 2016.

SHU, M. et al. Development of multi-species consortia biofilms of oral bacteria as an enamel and root caries model system. **Arch Oral Biol**, v. 45, p. 27-40, 2000.

SIENKIEWICZ, M. et al. Patents regarding essential oils and the significance of their constituents in human health and treatment. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov**, v. 7, n. 2, p. 133-140, 2012.

SIGNORETTO, C. et al. Effects of mushroom and chicory extracts on the shape, physiology and proteome of the cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*. **BMC Compl Alt Med**, v. 13, p. 1-14, 2013.

SIGNORI, C. et al. Influence of the inoculum source on the cariogenicity of in vitro microcosm biofilms. **Caries Res**, v. 50, p. 97-103, 2016.

SILVA, A. C. B. ***Streptococcus mutans* e cárie dentária: estudos sobre a perspectiva de identificação de pacientes de risco à cárie e potencial da clorexidina como agente antimicrobiano bucal**. 2010. 91 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

SILVA-JUNIOR, M. C. **100 árvores do cerrado: guia de campo**. Brasília: Rede de sementes do cerrado, 2005.

SILVEIRA, P. F. et al. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicas: uma realidade. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, n. 4, p. 1-9, 2008.

SIM, C. P. C. et al. Oral microbial biofilm models and their application to the testing of anticariogenic agents. **J Dent**, v. 50, p. 1-11, 2016.

SIMARK-MATTSSON, C. et al. Lactobacillus-mediated interference of mutans streptococci in caries-free vs. Caries-active subjects. **Eur J Oral Sci**, v. 115, p. 308-314, 2007.

SIMÕES, C. A. C. G. et al. Antibacterial activity of Copaiba oil gel on dental biofilm. **The Open Dent J**, v. 10, n. 1, p. 188-195, 2016.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: Editora da UFSC; 2004.

SOARES, M. J. S. et al. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to the Brazilian epidemic clone in a general hospital and emergence of heterogenous resistance to glycopeptide antibiotics among these isolates. **J Hosp Infect**, v. 44, p. 301-308, 2000.

SOARES, S. P. et al. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcóolico bruto de *Stryphnodendron adstringens* sobre microorganismos da cárie dental. **Rev Odont Cienc**, v. 23, n. 2, p. 141-144, 2008.

SOLMAZ, G.; KORACHI, M. Inhibition and disruption properties of chlorhexidine gluconate on single and multispecies oral biofilms. **Jundishapur J Microbiol**, v. 6, n. 1, p. 61-66, 2013.

SOUZA, L. P. **Padronização de extratos vegetais: Astronium urundeuva (Anacardiácea)**. Dissertação. Mestrado-Área de Concentração em Química- Universidade Estadual Paulista; Araraquara, 2012.

SOYAMA, P. Plantas medicinais são pouco exploradas pelos dentistas. **Cienc Cult**, v. 59, n. 1, p. 12-13, 2007.

SPRATT, D. A. et al. Evaluation of plant and fungal extracts for their potential antigingivitis and anticaries activity. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

STEINER-OLIVEIRA, C. et al. An in vitro microbial model associated with sucrose to produce dentin caries lesions. **Cent Eur Biol**, v. 6, n. 3, p. 414-421, 2011.

STRUZYCKA, I. The oral microbiome in dental caries. **Polish J Microbiol**, v. 63, n. 2, p. 127-135, 2014.

SWADAS, M. et al. Evaluation and comparison of the antibacterial activity against *Streptococcus mutans* of grape seed extract at different concentrations with chlorhexidine gluconate: in vitro study. **Int J Clin Ped Dent**, v. 9, n. 3, p. 181-185, 2016.

TEANPAISAN, R. et al. In vitro antimicrobial and antibiofilm activity of *Artocarpus lakoocha* (Moraceae) extract against some oral pathogens. **Trop J Pharm Res**, v. 13, n. 7, p. 1149-1155, 2014.

TEHRANI, M. H. et al. Comparing *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* colony count changes following Green tea mouth rinse or sodium Auoride mouth rinse use in children (randomized Double-blind controlled clinical Trial). **Dent Res J**, v. 8, p. 858-863, 2011.

TOKUHARA, C. K. et al. Effect of extract of the *Qualea Grandiflora* in matrix metalloproteinases. In: AADR/CADR GENERAL SESSION AND EXHIBITION, 45, 2016, Los Angeles. Cited: 2017 April 19. Available from: <https://aad2016.zerista.com/event/member/238760>.

TWETMAN, S. Antimicrobials in future caries control? A review with special reference to chlorhexidine treatment. **Caries Res**, v. 38, n. 3, p. 223-239, 2004.

VACCA-SMITH, A. M. et al. Characterization of glucosyltransferase of human saliva adsorbed onto hydroxyapatite surfaces. **Caries Res**, v. 30, n. 5, p. 354-360, 1996.

VACCA-SMITH, A. M.; BOWEN, W. H. Binding properties of streptococcal glucosyltransferases for hydroxyapatite, saliva-coated hydroxyapatite, and bacterial surfaces. **Arch Oral Biol**, v. 43, n. 2, p. 103-110, 1998.

VAN HOUTE, J. Bacterial specificity in the etiology of dental caries. **Int Dent J**, v. 30, n. 4, p. 305-326, 1980.

VASCONCELOS, M. C. A. et al. Avaliação da atividade biológica das sementes de *Stryphnodendron obovatum* Benth (Leguminosae). **Rev Bras Farmacogn**, v. 14, p. 121-127, 2004.

VOLPI, N.; BERGONZINI, G. Analysis of flavonoids from própolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. **J Pharm Biomed Anal**, v. 42, p. 354-361, 2006.

WAKAMATSU, R. et al. Penetration kinetics of four mouthrinses into *Streptococcus mutans* biofilms analyzed by direct time-lapse visualization. **Clin Oral Invest**, v. 18, p. 625-634, 2014.

WIMPENNY, J. W. The validity of models. **Adv Dent Res**, v. 11, n. 1, p. 150-159, 1997.

World Health Organization (WHO). WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005. Geneva: WHO, 2002.

YANG, L. et al. Current understanding of multi-species biofilms. **Int J Oral Sci**, v. 3, p. 74-81, 2011.

YOUSEFIMANESH, H. et al. Comparison of the antibacterial properties of three mouthwashes containing chlorhexidine against oral microbial plaques: an in vitro study. **Jundishapur J Microbiol**, v. 8, n. 2, p. 214-217.

ZANATTA, F. B.; RÖSING, C. K. Chlorexidine: action's mechanisms and recent evidences of its efficacy over supragingival biofilm context. **Scientifica**, v. 1, n. 2, p. 35-43, 2007.

ZAURA, E. et al. The effects of fractions from shiitake mushroom on composition and cariogenicity of dental plaque microcosms in an vitro caries model. **J Biomed Biotechnol**, 2011.

ZHENG, C. Y, WANG, Z. H. Effects of chlorhexidine, listerine and fluoride listerine mouthrinses on four putative root-caries pathogens in the biofilm. **Chin J Dent Res**, v. 14, n. 2, p. 135-140, 2011.