UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MARIA CAROLINA MARTINS MUSSI

Análise da atividade antimicrobiana dos óleos de copaíba (*Copaifera officinalis*) e de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) sobre *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*: determinação das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas e efeito de concentrações subinibitórias sobre a agregação

BAURU
2011

MARIA CAROLINA MARTINS MUSSI

Análise da atividade antimicrobiana dos óleos de copaíba (*Copaifera officinalis*) e de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) sobre *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*: determinação das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas e efeito de concentrações subinibitórias sobre a agregação

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Patologia Bucal.

Orientador: Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira

Versão corrigida

**BAURU
2011**

Mussi, Maria Carolina Martins

M976a Análise da atividade antimicrobiana dos óleos de copaíba (*Copaifera officinalis*) e de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) sobre *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*: determinação das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas e efeito de concentrações subinibitórias sobre a agregação / Maria Carolina Martins Mussi. – Bauru, 2011.
122 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira

Nota: A versão original desta dissertação 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, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

FOLHA DE APROVAÇÃO

O Último Discurso

“Desculpem, mas não quero ser um imperador, não é esse o meu ofício. Eu não quero conquistar e nem governar ninguém. Gostaria de ajudar a todos sempre que possível, judeus, gentios, negros e brancos.

Todos nós queremos ajudar uns aos outros, os seres humanos são assim. Desejamos viver para a felicidade do próximo, não para o seu sofrimento. Não queremos odiar ou desprezar uns aos outros. Nesse mundo há lugar para todos, a terra é boa e rica e pode prover a todos.

O caminho da vida pode ser livre e belo, mas nós nos perdemos no caminho. A ganância envenenou a alma do homem, criou uma barreira de ódio no mundo e nos guiou no caminho da miséria e derramamento de sangue. Nós desenvolvemos a velocidade, mas nos sentimos enclausurados dentro dela.

Máquinas, que produzem abundância, tem-nos deixado em penúria. Os nossos conhecimentos fizeram-nos céticos; nossa inteligência, empedernidos e cruéis. Pensamos muito e sentimos muito pouco. Mais do que máquinas, precisamos de humanidade. Mais do que inteligência, precisamos de bondade e ternura. Sem essas virtudes a vida será de violência e tudo será perdido.

A aviação e o rádio deixaram-nos mais próximos, a própria natureza dessas invenções clama pela bondade do homem, clama pela fraternidade universal e pela união de todos nós...”

Charles Chaplin

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, César e Neusa, à minha irmã Juliana, ao meu namorado, Fábio, aos meus familiares e aos meus amigos que me apoiaram durante a realização deste sonho.

*"...Ter saudade até que é bom
é melhor que caminhar vazio.*

A esperança é um dom que eu tenho em mim..."

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, César e Neusa, por me apoiarem em minhas decisões, por estarem sempre presente e fazerem a distância se tornar insignificante diante do amor que sinto por eles. Vocês são pra mim exemplos de determinação e postura perante a vida e me fazem ver que não importa o tamanho dos nossos problemas quando temos uns aos outros. Amo muito vocês.

À minha irmã, Juliana, por me fazer sorrir quando tive vontade de chorar, por poder compartilhar meus sonhos e segredos, por pensar tão diferente de mim e desse modo, me ensinar tanto, por apesar de não aparentar, ser a menina mais doce que já vi. Te amo muito Ju e sempre estaremos juntas.

Ao meu irmão Gabriel, que tanto irritei com minha preguiça, mas que me faz tão feliz pela sua presença e conversas. Por me levar ao cinema simplesmente para ficarmos juntos conversando e passando o tempo. Você é muito importante pra mim. Amo você.

Ao meu amor, Fábio, por me apoiar e incentivar a brigar por meus sonhos. Por me fazer enxergar a vida com menos seriedade, me ensinar a dar menos valor aos problemas pequenos, por me ajudar a encontrar respostas para minhas inúmeras perguntas e me incentivar diante de minhas curiosidades. Obrigada por estar sempre por perto e por todas as noites me fazer dormir melhor após longas conversas. Amo muito você e espero tê-lo sempre ao meu lado.

Ao meu cunhado Diogo, à Renata e à pequena Sarah, por todo carinho com que me tratam. À minha sogra Adla Maria Martins (*in memoriam*) por ser a pessoa mais gentil e generosa que tive a oportunidade de conhecer. Você faz falta para todos nós, mas foi uma honra poder ter convivido com você por todos esses anos.

Aos meus tios, tias, primos, primas e avós por sempre estarem por perto mesmo distantes. Em especial ao meu tio Roberto à minha tia Cristina, por sua imensa alegria e companheirismo, à Maiara por nos abençoar com o querido Cauã e a minha avó, Dona Nena, pelo carinho e diversão que me proporciona. Amo muito todos vocês e sei me apoiarão sempre.

Aos meus tios, assim os considero, Paulo e Made, por estarem sempre torcendo por mim e demonstrando inestimável afeto, amizade e carinho por toda minha família.

À minha grande companheira, Fer Pigatti, pela cumplicidade, carinho, lealdade, honestidade e amizade que destinou a mim. Por sempre que me sentia desanimada diante de uma maldade me oferecia a esperança. Sempre soube que você era uma pessoa iluminada, mas depois que morei com você tive ainda mais certeza disso. Muito obrigada pela companhia e paciência com que ouvia meus medos e por estar sempre ao meu lado quando precisei. E como Vinicius de Moraes menciona em uma de suas poesias: “A gente não faz amigos, reconhece-os”.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira, por todo o tempo destinado a mim, pelas palavras carinhosas vindas em momentos propícios e por todos os ensinamentos durante esses anos. Agradeço pela oportunidade e por toda sua atenção. Admiro-o pelo seu comportamento perante aos seus alunos e colegas de trabalho, mostrando-se sempre disponível a ajudar a todos.

A Profa. Dra. Márcia Pinto Alves Mayer, por ter aberto as portas de seu laboratório e ter me tratado com imenso carinho e atenção. Agradeço por todos seus ensinamentos e disponibilidade. Levo dessa convivência de apenas alguns meses uma imensa gratidão e uma admiração enorme por sua dedicação aos seus alunos e pela pesquisa. Muito obrigada por tudo.

A todo pessoal do laboratório 110 do ICBII. Adriana, Dione, Ellen, Erickson, Erika, Gláucia, João, Lucas, Lili, Maíke, Talyta, Silvia, Pâmela e Priscila por me acolherem tão bem e me tratarem como parte do grupo. Muito obrigado pelo auxílio disponibilizado e pelo carinho. Ao Léo, pelas aulas de matemática, pela paciência e ajuda imensurável na confecção do meu trabalho. Sentirei saudade de todos. Agradeço também à Profa. Dra. Maria Regina Lorenzetti Simionato por disponibilizar seu laboratório quando foi preciso.

Aos professores da disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira, Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira e Profa. Dra. Vanessa Soares Lara pelos ensinamentos e atenção voltados aos alunos, contribuindo para nosso engrandecimento e ao Prof. Dr. Alberto Consolaro.

À Cris, secretária do departamento de Patologia Bucal, por sua alegria, disponibilidade e bom humor indiscutíveis e por todo carinho e atenção dirigidos a todos, sem distinção.

À Fatiminha, técnica do laboratório de Patologia Bucal, por sua eficiência e convívio. Ao André, técnico do laboratório de Microbiologia, pela ajuda e materiais cedidos. À Marilza, à Carla e “Seu” Carlos pela convivência agradável.

Ao Anderson, funcionário do setor de compras da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, pela imensa paciência e competência, fazendo sempre o possível e o impossível para adiantar os materiais. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann, pelo exemplo de seriedade e comprometimento com os alunos. Vejo em você muitas qualidades das quais almejo alcançar. Muito obrigada por estar sempre disponível para ouvir minhas dúvidas, agonias e vitórias. Admiro-o como professor e ser humano.

Ao Prof. Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira, pelos ensinamentos na área e por despertar em mim o amor pela Patologia.

Ao Prof. Dr. Heitor Marques Honório e à Profa. Dra. Daniela Rios pela amizade, conselhos e ensinamentos.

Aos queridos amigos, Ana Regina, pelos conselhos e carinho; Dryka, pela coragem e determinação; Heliton, pela alegria e bom humor inestimáveis, Cris e Karen. A vocês agradeço por todos os momentos de alegria e tristeza divididos. Obrigada por estarem ao meu lado sempre que precisei, me dando força para seguir em frente. O curso deste caminho tornou-se muito mais leve por saber que podia contar com vocês.

À Priscila, minha companheira e amiga, pelos inúmeros ensinamentos. Admiro sua coragem de enfrentar os problemas e, mesmo assim, cultivar a alma de uma menina meiga e capaz de amar, de maneira ingênua e simples, quem cruze o seu caminho. Muito obrigada pelas noites de conversa e filmes. Sinto saudade.

À Carol Menezes, pelo carinho, atenção, educação e bons momentos.

À Elo, Natália, Mariana pela alegria e honestidade que vejo em vocês. Apesar do pouco tempo de convívio tenho muito carinho por todas.

Ao Aroldo (*in memoriam*), que desde a graduação, foi um exemplo de integridade, caráter e dedicação a ser seguido.

À Bruna e à Taísa Vilardi pela convivência da qual tirei lições valiosas.

Aos demais colegas de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo: Alexandre, Carolina Goulart, Carine, Bruno, Diego Maurício, Érika, Kellen, Pati, Simone, Sylvie e Taiane pela convivência e trocas de experiências desses dois anos.

Aos alunos da XLVIII turma de Odontologia da Universidade de São Paulo, pela consideração e carinho com que me trataram durante o desenvolvimento do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

À Ana, ao Bruno e à Celina, que são amigos que já fazem parte da minha família e mesmo estando longe sei que posso contar com vocês. Amo muito vocês e sinto muita saudade de nossas conversas. Aos amigos de Alfenas: Bel, Carioca, Fregnan, Let's, Moi, Nadine, Talita, Tufo, Vinição, Lynus, Hermano e Diogo, por me fazerem ficar ansiosa para revê-los todo fim de ano e me proporcionarem momentos de muita alegria. Sinto saudade de todos os integrantes do distinto e seletto grupo Alfêmeas.

À minha amiga, Renata Lillian, ou se preferir, vó Rena, por todo tempo em que moramos juntas, por sempre se mostrar preocupada em agradar a todos, ser extremamente carinhosa com as pessoas e sempre mostrar muita pureza, acreditando em tudo o que lhe dizem. Sinto muita saudade amiga.

À Dai, Juli, Thiago e ao novo integrante, Leonardo, pela amizade de longa data e os momentos felizes e inesquecíveis.

A todos que participaram da confecção do trabalho. Sem vocês a realização desse sonho seria impossível.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa do Prof. Dr. José Carlos Pereira, diretor desta instituição.

À comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa do Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti.

À Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

Ao Departamento de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pela cedência de materiais e aparelhos.

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

Aos funcionários da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, pela disponibilidade e eficiência.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Bauru e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

“E os saberes sobre as plantas, que curam, se consolidariam como precursores das ciências farmacêuticas sob novas nomenclaturas e com outras nacionalidades. Os saberes dos brasilíndios foram silenciados enquanto cientistas estrangeiros extraíam o princípio ativo das plantas brasileiras...”

(Marques, 1999)

RESUMO

A cavidade bucal é um habitat microbiano complexo que apresenta mais de 500 espécies bacterianas como componentes da microbiota. A saúde periodontal está estabelecida quando há equilíbrio entre os microrganismos patogênicos e o hospedeiro. O digluconato de clorexidina é um dos antimicrobianos bucais mais utilizados, no entanto, essa substância tem sido associada a alguns efeitos colaterais indesejáveis. Os óleos de copaíba e de melaleuca tem sido estudados como importantes fitoterápicos, devido aos seus diversos efeitos, entre eles ação antibacteriana. Partindo-se do princípio de que o óleo copaíba e de melaleuca possuem atividade antimicrobiana e de que não há dados suficientes na literatura utilizando esses fitoterápicos sobre *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, foram preparados testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) das bactérias *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 3327) frente ao digluconato de clorexidina e aos óleos provindos de *Copaifera officinalis* e de *Melaleuca alternifolia*. Realizaram-se ainda testes para determinação de Concentração Subinibitória (CS) e ensaios para determinar a capacidade de autoagregação e coagregação dessas bactérias expostas às concentrações subinibitórias das soluções testadas. Como controles foram utilizados apenas meio de cultura e meio de cultura acrescido de Tween 80. Todos os óleos utilizados tiveram sua composição analisada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. O óleo de melaleuca, após identificação de sua composição, apresentou, respectivamente, os seguintes constituintes em maiores concentrações: terpin-4-ol, γ -terpineno, α -terpineno, terpinoleno e 1,8-cineol. O óleo de copaíba apresentou como principais constituintes, respectivamente, trans-cariofileno, germacreno B, α -humuleno, germacreno D e α -copaeno. Os resultados obtidos como CIM para *F.nucleatum* foram semelhantes à CBM em todas as soluções testadas. Para a bactéria *P.gingivalis*, todas as soluções testadas inibiram o crescimento bacteriano, contudo, os resultados obtidos durante a determinação da CBM demonstraram que o óleo de copaíba foi bacteriostático. Todas as soluções testadas inibiram o processo de autoagregação e apenas o óleo de copaíba foi eficiente na inibição do processo de coagregação entre *F.nucleatum* e *P.gingivalis*. Esses dados sugerem que as três soluções testadas apresentam relevantes mudanças no desenvolvimento normal de *P.gingivalis* e *F.nucleatum*, bem como influenciam no processo de autoagregação de *F.nucleatum*. O óleo de copaíba demonstrou ter uma notável propriedade de inibir o processo de coagregação entre as bactérias testadas neste estudo.

Palavras-chave: Óleos vegetais. Fitoterapia. *Fusobacterium nucleatum*. *Porphyromonas gingivalis*.

ABSTRACT

Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera officinalis*) and melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) oils on *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*: determination of minimum inhibitory and bactericidal concentrations and subinibitory effect on the aggregation

The oral cavity is a complex microbial habitat that has more than 500 bacterial species as components of the microbiota. Periodontal health is established when there is equilibrium between pathogens and host. The chlorhexidine digluconate is one of the most commonly used oral antibiotics, however, this substance has been associated with some undesirable side effects. Copaiba and melaleuca oils have been studied as important herbal medicines because of their effects, including antibacterial action. Based on the principle that the copaiba oil and tea tree have an antimicrobial activity and that is no sufficient data in the literature using these herbal medicines against *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) tests of *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586) and *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 3327) related to chlorhexidine digluconate and oils coming from *Copaifera officinalis* and *Melaleuca alternifolia*, were prepared. Assays were performed to determine the subinibitory concentration and the capacity of those bacteria to autoaggregation and coaggregation when exposed to subinibitory concentrations, previously tested. Medium and medium added Tween 80 were used as a control. All oils used had their composition analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. The tea tree oil mainly chemical compounds were identified as terpin-4-ol, γ -terpinen, α -terpinen, terpinolene and 1,8-cineole while copaiba oil presented as its main constituents trans-caryophyllene, germacrene B, α -humulene, germacrene D and α -copaene. The MIC results for *F.nucleatum* were similar to the CBM data in all solutions. For the bacterium *P. gingivalis*, all solutions tested inhibited bacterial growth, however, the results obtained during the determination of CBM showed that the copaiba oil was bacteriostatic. All solutions tested inhibited the autoaggregation process but only copaiba oil was effective in inhibiting the coaggregation between *F.nucleatum* and *P. gingivalis*. These data suggest that all the solutions tested in this study have relevant changes in the normal development of *P.gingivalis* and *F.nucleatum* as well in the influence of the autoaggregation process of *F.nucleatum* yet Copaiba oil also demonstrated to have remarkable properties to change coaggregation between the bacteria used in this study.

Keywords: Plants oils. Phytotherapy. *Fusobacterium nucleatum*. *Porphyromonas gingivalis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Tubo de ensaio contendo água acrescida de óleo de copaíba a 100 µL/mL.....	59
Figura 2 -	Soluções de estoque de óleos de copaíba, melaleuca e de digluconato de clorexidina.....	61
Figura 3 -	Placa de ágar demonstrando a distribuição das gotas (10 µL) dos inóculos, onde o amarelo representa <i>Fusobacterium nucleatum</i> e o verde <i>Porphyromonas gingivalis</i> . A seta foi utilizada para a identificação das bactérias.....	63
Figura 4 -	Microplacas de 96 poços de fundo redondo, mostrando as combinações realizadas entre as bactérias tratadas para o ensaio de coagregação (A) e autoagregação (B) , os quais apresentam <i>P.gingivalis</i> , Pg; <i>F.nucleatum</i> , Fn; <i>P.gingivalis</i> que foram expostas ao óleo de melaleuca, Pg(M); <i>P.gingivalis</i> , Pg(C); <i>P.gingivalis</i> tratadas com digluconato de clorexidina, Pg(X); <i>F.nucleatum</i> expostas ao óleo de melaleuca, Fn(M); <i>F.nucleatum</i> expostas ao óleo de copaíba, Fn(C), <i>F.nucleatum</i> expostas ao digluconato de clorexidina, Fn(X) e tampão de coagregação (T). Antes da introdução destes inóculos na microplaca, todos foram lavados duas vezes com tampão de agregação	67
Figura 5 -	Placas de ágar Brucella acrescido de sangue e suplementado como hemina e vitamina K, contendo os agentes testados, inoculadas com inóculos padronizados de <i>F. nucleatum</i> e <i>P. gingivalis</i> . Em (A) placa controle negativo, mostrando crescimento de <i>F.nucleatum</i> (fileira central) e <i>P.gingivalis</i> (fileira direita) Em (B) placa com óleo de copaíba a 20 µL/mL mostrando apenas crescimento de <i>F.nucleatum</i> . Em (C), placa com digluconato de clorexidina a 2µg/mL mostrando crescimento bacteriano. Em (D), placa com óleo de copaíba 100 µL/mL e em (E), placa contendo óleo de melaleuca 20 µL/mL	75
Figura 6 -	Microplaca contendo bactérias em processo de coagregação.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Meios de cultura preparados com as soluções ativas (quantidades para duas placas de Petri).....	62
Tabela 2 -	Analitos identificados no óleo de copaíba	72
Tabela 3 -	Analitos identificados no óleo de melaleuca.....	73
Tabela 4 -	Valores médios de UFC/ml de cultura de <i>P. gingivalis</i> e <i>F. nucleatum</i> em $Abs_{560nm} \sim 0,7$	74
Tabela 5 -	Diferença de OD_{655nm} em diferentes intervalos de tempo em ensaio de autoagregação de <i>F.nucleatum</i> expostas ao pré-tratamento com concentração subinibitória de digluconato de clorexidina (X), óleo de melaleuca (M) e óleo de copaíba (C) e no controle não tratado (Fn).....	79
Tabela 6 -	Diferença de OD_{655nm} em diferentes intervalos de tempo em ensaio de coagregação entre <i>F.nucleatum</i> expostas ao pré-tratamento com <i>P.gingivalis</i> sem tratamento	81
Tabela 7 -	Diferença de OD_{655nm} em diferentes intervalos de tempo em ensaio de coagregação entre <i>P.gingivalis</i> expostos ao pré-tratamento e <i>F.nucleatum</i> sem tratamento	82
Tabela 8 –	Resultado do processo de coagregação entre <i>P.gingivalis</i> e <i>F.nucleatum</i> expostas ao pré-tratamento	83

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Celsius
%	Porcentagem
µm	Micrometro
µL	Microlitro
µg	Micrograma
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
m	Metro
mM	Milimolar
p	Nível de significância
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
<i>F.nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>P.gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
FDA	Food and Drug Administration
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
g	Gramas
cm ³	Centímetros cúbicos
KOH	Hidróxido de potássio
Kg	Quilograma
meq	Miliequivalente
min	Minuto
DMSO	Dimetilsulfóxido
UFC	Unidade Formadora de colônia
DO	Densidade óptica
Abs	Absorbância
nm	Nanômetro
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CS	Concentração Subinibitória
<i>g</i>	Força gravitacional
BHI	Caldo Infusão de Cérebro e Coração
t _R	Tempo de arraste
IR	Índice de retenção

SUMÁRIO

1	Introdução	19
2	Revisão de Literatura	25
2.1	Doença Periodontal: formação de biofilme e progressão	27
2.2	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	30
2.3	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	32
2.4	Digluconato de Clorexidina	35
2.5	Fitoterapia: breve histórico.....	37
2.6	Copaíba: histórico, aplicações e aspectos gerais	40
2.7	Melaleuca: histórico, aplicações e aspectos gerais	45
3	Objetivos	51
4	Material e métodos	55
4.1	Análises físico-químicas e cromatográficas dos óleos de copaíba e melaleuca.....	57
4.2	Preparo das soluções a base de <i>Copaifera Officinalis</i> e <i>Melaleuca alternifolia</i>	58
4.3	Microrganismos	59
4.4	Padronização do inóculo.....	60
4.5	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das soluções testadas	60
4.6	Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) das soluções testadas	63
4.7	Determinação do efeito das substâncias testadas em Concentração Subinibitória sobre a autoagregação e coagregação de <i>P. gingivalis</i> e <i>F. nucleatum</i>	65
4.7.1	Determinação da Concentração Subinibitória.....	65
4.7.2	Ensaio de Coagregação e Autoagregação	66

5	Resultados	69
5.1	Identificação do óleo de <i>Melaleuca alternifolia</i> e de <i>Copaifera officinalis</i>	71
5.2	Análise da concentração inibitória mínima das soluções testadas	74
5.2.1	Padronização do inóculo de <i>P. gingivalis</i> e <i>F. nucleatum</i>	74
5.2.2	Concentração Inibitória Mínima (CIM)	74
5.3	Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	75
5.4	Determinação das concentrações subinibitórias.....	77
5.5	Correlação entre as soluções testadas e o controle negativo em ensaio de autoagregação	78
5.6	Correlação entre as soluções testadas e o controle negativo em ensaio de autoagregação	80
6	Discussão.....	85
7	Conclusão	101
	Referências	105

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é um habitat microbiano complexo que apresenta muitas espécies bacterianas como componentes (OGAWA, 2004). Acredita-se que 1 mL de saliva contenha mais de 100 milhões de bactérias e que a cavidade bucal seja habitada por mais de 500 espécies bacterianas (MESTECKY, 2005).

Algumas dessas bactérias possuem características de comensalismo, portanto apresentam comportamento não prejudicial à saúde bucal, enquanto outras são consideradas patogênicas. A colonização de bactérias patogênicas na cavidade bucal depende da relação com os microrganismos comensais (KOLENBRANDER et al., 2006).

A periodontite é considerada uma doença infecciosa e inflamatória (LINDHE, 1999) causada principalmente pelo acúmulo de biofilme bacteriano nos dentes e gengiva (NEWMAN et al., 2004).

Alguns microrganismos liberam produtos tóxicos capazes de sensibilizar a resposta imunológica do hospedeiro, causando a inflamação gengival (MENG et al., 2007; PATHIRANA et al., 2010). Determinados casos dessa doença podem se agravar e evoluir para acometimento de outros tecidos periodontais, causando a periodontite (ABUL et al., 2006; VOGT, 2006), ou seja, as doenças periodontais representam infecções bacterianas mistas e dinâmicas causadas por associação de tipos bacterianos e resposta do hospedeiro, que podem variar com o tempo (CARRANZA, 1983).

Dentre as bactérias envolvidas no processo patológico do periodonto, algumas têm sido relacionadas como agentes etiológicos primários, como *Porphyromonas gingivalis*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* e *Campylobacter rectus*. Acredita-se que essas bactérias sejam responsáveis pela gengivite e periodontites crônica, agressiva e necrosante (OGAWA, 2004).

O objetivo essencial do tratamento das doenças periodontais é eliminar ou reduzir seus patógenos (DUMITRESCU, 2011). Para obter sucesso clínico,

tradicionalmente, utiliza-se uma associação de procedimentos que incluem educação do paciente em relação ao hábito de escovação bucal diária, limpeza dentária mecânica (cirúrgica e não cirúrgica) (LINDHE, 1992) e terapia periodontal de suporte (geralmente em intervalo de 3 a 6 meses) (NEWMAN et al., 2004).

A aplicação tópica de um medicamento para o controle da prevenção da doença periodontal é desejável, tendo em vista a redução de complicações e problemas relacionados à medicação utilizada. Ensaios clínicos, que associaram o uso de antibioticoterapia local à raspagem e ao alisamento radicular no tratamento da periodontite crônica, sugerem redução de maior profundidade da bolsa associada, ou não, a ganhos no nível de inserção em pacientes tratados com adjuvante antimicrobianos administrados localmente, como o digluconato de clorexidina (DUMITRESCU, 2011).

A utilização de extratos vegetais, com conhecidas propriedades antimicrobianas, pode ser de grande importância em muitos tratamentos. Muitas plantas têm sido utilizadas devido as suas características antimicrobianas, atribuídas, muitas vezes, aos compostos sintetizados no metabolismo secundário da planta (CARSON et al., 2006; COWAN, 1999).

A copaibeira (*Copaifera* sp.) é uma árvore de grande porte que possui um óleo-resina e é uma das plantas medicinais mais utilizadas pela população amazônica (LOPEZ et al., 2008). O óleo de copaíba tem, descrito na literatura, inúmeros atributos com potencial para uso na medicina e odontologia, como a sua ação anti-inflamatória (DWYER, 1951; RAMOS, 2006; VEIGA JUNIOR et al., 2002), antimicrobiana (PIERI et al., 2010a; PIERI et al., 2010b) e antisséptica (CASCON, 2004; RAMOS, 2006; VEIGA JUNIOR et al., 2002).

Estas características desejáveis podem, futuramente, propiciar seu uso como um agente quimioterápico no tratamento e prevenção das doenças periodontais (PIERI et al., 2009). Estudos recentes têm procurado comprovar tais atividades descritas em ensaios laboratoriais, além de comprovar ação antimicrobiana do óleo copaíba sobre algumas bactérias formadoras da placa bacteriana (PIERI et al., 2009; PIERI et al., 2010).

Outra substância utilizada é o óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), que apesar de ter se tornado muito popular na última década, tem sido utilizado na

Austrália por quase cem anos (CARSON et al., 2006). Nos últimos tempos, sua reputação tem aumentado devido ao seu efeito antisséptico seguro, relativamente eficaz e natural (COX et al., 2000; HAMMER et al., 2006). Atualmente, é incorporado como o antimicrobiano principal ou como um conservante natural em muitos produtos farmacêuticos e cosméticos destinados ao uso tópico (COX et al., 2000). No campo da Odontologia, o óleo oriundo de *Melaleuca alternifolia* tem sido testado contra bactérias encontradas no biofilme bucal (HAMMER et al., 2003; SHAPIRO et al., 1994). Estes estudos indicam que uma série de bactérias orais é susceptível ao óleo, sugerindo seu uso em produtos direcionados a promoção da saúde e na manutenção da higiene bucal (HAMMER et al., 2003).

Partindo-se do princípio de que o óleo copaíba e de melaleuca possuem características desejáveis a um agente antimicrobiano e de que não há dados suficientes na literatura utilizando estes fitoterápicos sobre *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, duas importantes bactérias periodontopatogênicas, viu-se a importância em avaliar a inibição no crescimento e alteração no processo de coagregação e autoagregação destas bactérias quando em contato com essas duas soluções.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença Periodontal: formação de biofilme e progressão

As doenças periodontais são as patologias que acometem o periodonto, ou seja, as estruturas circunjacentes ao elemento dental (CARRANZA, 1983) que incluem tecidos periodontais de proteção (gengiva inserida e livre) e tecidos de sustentação (osso alveolar, cemento e ligamento periodontal) (LINDHE, 1999; VOGT, 2006). Suas principais funções são fornecer suporte aos dentes inseridos aos ossos dos maxilares e manter integridade da mucosa mastigatória da cavidade bucal (LINDHE, 1999).

A patogênese da doença periodontal destaca a participação de vários fatores que podem influenciar o seu início, a taxa de progressão, as características clínicas dessa doença e sua resposta ao tratamento. Esses fatores são a especificidade e a patogenicidade da microbiota envolvida, respostas imunológica e inflamatória do hospedeiro, fatores de risco ambientais e adquiridos, características do metabolismo dos tecidos conjuntivo e ósseo alveolar, assim como fatores de risco genéticos (LINDHE, 1999).

A complexidade da microbiota gengival vem sendo alvo de estudos desde a primeira análise microscópica desse ecossistema, realizada por Van Leeuwenhoek, o qual relatou suas observações à Sociedade Real de Londres, em 1684, denominando sua descoberta como “pequenos animálculos” (MADIGAN et al., 2004, SOCRANSKY et al., 1998).

O biofilme dental é uma comunidade bacteriana complexa influenciada por fatores do meio ambiente externo que podem ser mediados pelo hospedeiro (NEWMAN et al., 2004). O revestimento de um dente limpo recentemente ocorre dentro das primeiras horas por uma película na superfície da estrutura dental constituída por numerosos componentes, incluindo mucina, glicoproteínas, proteínas ricas em prolina, proteínas ricas em histidina, enzimas, fosfato e outras moléculas encontradas na saliva e fluido do sulco gengival. A formação da película favorece a

colonização bacteriana inicial, fornecendo superfícies susceptíveis à fixação de outras bactérias. Os estreptococos são uns dos colonizadores iniciais e ligam-se as proteínas ácidas ricas em prolina e em receptores encontrados na película (WHITTAKER et al., 1996). Após a colonização inicial por cocos e bastonetes Gram-positivos, cocos e bastonetes Gram-negativos passam então a compor o biofilme, seguidos pelo aparecimento de Fusobactérias. Finalmente, ocorre o aparecimento de grande quantidade de espirilos e espiroquetas (THEILADE et al., 1966). O surgimento clínico da gengivite está correlacionado ao aparecimento das formas Gram-negativas (SOCRANSKY et al., 2005) .

Os produtos metabólicos de alguns microrganismos podem promover o desenvolvimento de algumas bactérias ou prevenir o aparecimento de outras. Um papel chave nesse processo é *Fusobacterium nucleatum* que possibilita a ligação entre os colonizadores iniciais e os tardios, especialmente anaeróbios. Na ausência de *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* não consegue agregar com a microbiota existente (DUMITRESCU et al., 2011).

De maneira abrangente, a microbiota do biofilme dental e os seus produtos atuam como agentes irritantes que desencadeiam a resposta inflamatória e imunológica no tecido gengival contíguo. A resposta inflamatória consiste na primeira linha de defesa do organismo contra os agentes agressores. O processo inflamatório envolve a liberação de mediadores químicos que desencadeiam alterações no plexo vascular, caracterizadas por aumento do fluxo sanguíneo local, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Simultaneamente, diversos mediadores químicos e fatores quimiotáticos estimulam a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e nos leucócitos, o que favorece a adesão das células inflamatórias à parede vascular e sua migração para o meio extravascular, resultando na formação do exsudato (ABUL et al., 2006; VOGT, 2006). À medida que a deposição do biofilme bacteriano sobre o dente torna-se estruturalmente mais complexa, os fenômenos inflamatórios se exacerbam e observa-se um aumento no volume do exsudato inflamatório (LINDHE, 1999; VOGT, 2006).

Apesar das bactérias periodontopatogênicas serem imprescindíveis para a progressão da doença periodontal, alguns fatores associados ao hospedeiro, tais como herança genética (DUMITRESCU, 2011), fumo de tabaco (DUMITRESCU, 2011), exposição ao estresse emocional (RAI et al., 2011) e doenças sistêmicas

(BJELLAND et al., 2002), podem participar do agravamento dessa doença. Esses fatores influenciam na progressão da doença periodontal e alteram a resposta do hospedeiro, portanto, estão envolvidos na determinação da suscetibilidade à doença (MENG et al., 2007).

Uma pessoa com gengiva sadia, com hábitos de higiene oral suspensos, passa a ter acúmulo de bactérias sobre as superfícies dos dentes, predominando, nas quatro primeiras horas, estreptococos e bacilos Gram-positivos. Esses microrganismos diminuem durante a gengivite e periodontite. Concomitantemente, durante a progressão da doença periodontal ocorre um aumento na quantidade de bactérias Gram-negativas, como: *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella intermedia*, entre outros (LINDHE, 1999; NEWMAN et al., 2004; OGAWA, 2004).

Alguns microrganismos são importantes para o desenvolvimento da doença periodontal, participando da perda de inserção do tecido conjuntivo e da perda óssea característico dessa enfermidade, como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Peptostreptococcus micros* e *Streptococcus intermedius* (ZAMBON, 1996).

Avaliações de sondagem têm demonstrado que algumas espécies bacterianas, frequentemente, aparecem em associação nas amostras de biofilmes subgengivais (SOCRANSKY et al., 1998). O processo de coagregação foi primeiramente relatado por Gibbons & Nygaard, em 1970, e é definido como o reconhecimento entre as moléculas de superfície de dois tipos de células bacterianas diferentes, culminando na formação de um agregado de células mistas (WHITTAKER et al., 1996).

Muitas bactérias da cavidade bucal humana estão envolvidas no evento de coagregação e acredita-se que essas interações tenham um papel importante na adesão e colonização bacterianas às superfícies (BRADSHAW et al., 1998). As interações são altamente específicas nas quais diferentes tipos bacterianos específicos interagem (SOCRANSKY et al., 1998).

Um evento fisiológico inicial de grande importância que pode ocorrer durante o desenvolvimento de um biofilme, e que pode ser importante na adesão de colonizadores secundários, é o aumento da produção de substâncias poliméricas

extracelulares. Esses polímeros envolvem as células do biofilme e fortalecem a adesão entre elas, além de poderem possuir a capacidade de atuar como receptores para as interações de coagregação (RICKARD et al., 2003).

2.2 *Fusobacterium nucleatum*

Durante a última década do século XIX, muitos autores observaram bacilos, fusiformes, encontrados em materiais colhidos da boca humana em estado de saúde e doença (HOFSTAD, 2006). Knorr, em 1923, propôs o termo *Fusobacterium*, para designar bacilos Gram-negativos com aparência fusiforme. A sétima edição do “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” dividiu a família Bacteroidaceae dentro de três gêneros: *Bacteroides*, relacionado aos bastonetes com extremidades arredondadas; *Fusobacterium*, destinado aos bastonetes com extremidade afilada e *Sphaerophorus*, para designar bastonetes que apresentavam extremidades arredondadas com acentuado pleomorfismo e com a presença incomum de filamentos.

Contudo, estudos de DNA e fisiologia dessas bactérias, mostraram não haver evidências suficientes para separar os gêneros *Sphaerophorus* e *Fusobacterium*. Portanto, na oitava edição do Bergey’s Manual, o gênero *Fusobacterium* foi relacionado a bastonetes Gram-negativos, anaeróbios, não esporulados. Esses microrganismos obtêm energia a partir de peptídeos e aminoácidos que quando fermentados dão origem a uma mistura de ácido butírico e acético (KAPATRAL et al., 2002; HOFSTAD et al., 2006).

Até 2006, havia 13 espécies humanas de *Fusobacterium* adequadamente descritas: *F. nucleatum*, *F. necrophorum*, *F. alocis*, *F. gonidiaformans*, *F. mortiferum*, *F. naviforme*, *F. necrogenes*, *F. periodonticum*, *F. prausnitzii*, *F. russii*, *F. sulci*, *F. ulcerans* e *F. Varium*, sendo que dessas apenas cinco apresentam-se como microbiota normal da cavidade bucal, entre elas encontra-se *F. Nucleatum* (HOFSTAD et al., 2006).

Fusobacterium nucleatum é uma bactéria anaeróbia estrita, Gram-negativa, imóvel, não esporulante e uma das mais comuns nas infecções humana e animal (OGAWA, 2004). Essa bactéria é mais bem isolada da saliva ou da bolsa periodontal

e apesar de ser anaeróbia, cresce na presença de até 6% de oxigênio (HOFSTAD et al., 2006).

Segundo sua taxonomia, pertence à classe Fusobacteria, ordem Fusobacteriales, família Fusobacteriaceae, gênero *Fusobacterium* e espécie *Fusobacterium nucleatum* (NCBI, 2010).

Apesar da espécie *F.nucleatum* ser considerada bastante heterogênea (BOLSTAD, 1996; KAPATRAL et al., 2003), a maioria das suas células bacterianas mede entre 5 a 10 µm de extensão e apresenta extremidades pontiagudas, no entanto a morfologia da colônia bacteriana não pode ser considerada um parâmetro para Fusobacteria e não é suficiente para a diferenciação entre as espécies (TUNÉR et al., 1992). *F.nucleatum* pode produzir beta-lactamase, aumentando sua resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, como a penicilina (VOHA et al., 2006).

Esse patógeno é encontrado na cavidade bucal, onde é um dos anaeróbios Gram-negativos mais abundantes na região subgengival (KAPATRAL et al., 2003; MOORE et al., 1994). Durante a evolução da doença periodontal, sua massa celular aumenta muito podendo alcançar 10.000 vezes sua quantidade inicial, tornando-se uma das espécies de anaeróbios mais abundantes nos sítios doentes (MOORE et al., 1994). Contudo esses microrganismos também podem ser encontrados em locais saudáveis da cavidade bucal (KAPATRAL et al., 2003; MOORE et al., 1994).

Na cavidade bucal, essas bactérias podem ser encontradas nas periodontites laterais e apicais, polpas necrosadas, pericoronarites, abscessos e halitose (LIU et al., 2009), contudo podem ainda estar envolvidas em doenças em outras partes do corpo (OGAWA, 2004).

Nos estágios iniciais da doença periodontal, *Streptococcus* spp. e outras bactérias aderem e colonizam o esmalte dental e a superfície radicular. Essa fase inicial permite que posteriormente a coagregação de *F.nucleatum* com esses colonizadores iniciais participando, dessa forma, na colonização final para culminar na formação do biofilme. As Interações físicas são muito específicas entre os vários gêneros nessa comunidade microbiana complexa (KAPATRAL et al., 2002).

A interação entre as bactérias bucais e as células epiteliais da gengiva é um aspecto essencial da doença periodontal. Han et al. (2000), em um modelo experimental *in vitro* utilizando cultura primária de células epiteliais de gengiva

humana e células KB, observou que *F.nucleatum* apresentou capacidade de aderir e invadir ambos tecidos e estimulou a produção da interleucina-8 pelo tecido epitelial. Essa bactéria também pode coagregar com uma ampla variedade de microorganismos na cavidade oral e desempenhar um papel importante na formação do biofilme (BRADSHAW et al., 1998).

Devido as suas diversas propriedades, *F. nucleatum* permite a adesão de bactérias importantes para o estabelecimento da doença periodontal como a *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema dentícola*, entre outros. Em referência a essa propriedade, é referida como uma “bactéria-ponte” (BOLSTAD et al., 1996). A interação entre *F.nucleatum* e *P.gingivalis* mostra-se muito específica, intercedida por uma adesina galactose-mediada (METZGER et al., 2009).

2.3 *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis é um cocobacilo anaeróbico, Gram-negativo, imóvel (SHAH et al., 1988; GIBSON et al., 2006), pertencente ao filo Bacteroidetes, classe Bacteroidia, ordem Bacteroidales, família Porphyromonadaceae, gênero *Porphyromonas*, espécie *Porphyromonas gingivalis* (NCBI, 2011).

O gênero *Porphyromonas* e, em particular, a espécie *gingivalis* são classificações relativamente novas e foram delineadas a partir de *Bacteroides melaninogenicus* (SHAH et al., 1988). Oliver & Wherry (1921), relataram o isolamento de bactérias cocobacilos Gram-negativas, morfologicamente semelhantes, a partir de uma variedade de infecções. Esses microrganismos, após 1 a 2 semanas em anaerobiose a 37°C, cresceram e produziram colônias contendo pigmentos enegrecidos quando cultivadas em ágar sangue (OLIVER et al., 1921).

Acreditava-se que o pigmento preto produzido por essas bactérias fosse melanina, portanto, foi utilizada a denominação de *Bacteroides melaninogenicus* (OLIVER et al., 1921). Contudo, Schwabacher et al.(1947) descobriram que o pigmento enegrecido produzido por esses microrganismos era formado apenas na presença de sangue e que sua formação coincidia com o desaparecimento de hemoglobina indicando que provavelmente esse pigmento seria um produto de

degradação da hemoglobina. Na ausência de sangue no meio de cultura, a *P.gingivalis* não formava pigmentos (SCHWABACHER et al., 1947).

Desse modo, como os pigmentos foram erroneamente identificados como melanina, esse fato ocasionou na substituição do seu nome para *Bacteroides nigrescens* (OLSEN et al., 1999). Schwabacher et al., em 1947, classificaram esse grupo de bactérias como membros do gênero *Fusiformis* e aprovaram o nome *Fusiformis nigrescens* para as espécies que produziam colônias pigmentadas de negro em placas de ágar sangue. O termo *Bacteroides* voltou a ser utilizado na sétima edição do “Bergey’s manual”, e o termo *Bacteroides melaninogenicus* passou a ser considerado uma designação taxonômica válida (BREED et al., 1957).

No entanto, ainda havia heterogeneidade dentro do grupo *Bacteroides*, tanto em relação à formação dos pigmentos quanto em relação às propriedades bioquímicas. Estudos filogenéticos dessa bactéria demonstraram similaridades particulares com o gênero *Porphyromonas* e enfatizaram sua diferença com *Bacteroides* e *Prevotella* (OLSEN et al., 1999).

P. gingivalis cresce rapidamente a 37 °C e inicialmente, quando cultivadas em ágar contendo sangue, as colônias apresentam coloração esbranquiçada. Conforme o crescimento bacteriano aumenta, próximo de 4 a 8 dias, estas bactérias chegam a adquirir uma coloração escura que foi correlacionada à produção de protoheme e o ágar passa a apresentar a aparência de ágar simples (GIBSON et al., 2006; SCHWABACHER et al., 1947). Esses microrganismos crescem em meios de cultura formando colônias convexas, lisas, brilhantes, com 1 a 2 mm de diâmetro (OLIVER et al., 1921).

Entre as muitas espécies bacterianas provenientes do biofilme subgengival, há evidências de que a *P.gingivalis* seja o principal agente etiológico das apresentações severas de periodontite crônica (OLSEN et al., 1999; PATHIRANA et al., 2010; YANG et al., 2004). Yang et al.(2004) analisaram amostras coletadas de 407 pacientes diagnosticados com doença periodontal e comprovaram a presença de *P.gingivalis* em 85,7% das amostras, sugerindo que essa bactéria esteja intimamente relacionada à patogênese da doença.

Pesquisas realizadas por vários grupos, com a finalidade de analisar a presença de *P. gingivalis* em pacientes com o periodonto saudável detectaram níveis baixos ou a ausência da bactéria nesses pacientes (GRIFFEN et al., 1998).

Embora essa bactéria tenha sido encontrada na língua, tonsila, saliva e em amostras de biofilme supragengival, acredita-se que *Porphyromonas gingivalis* colonize exclusivamente sítios subgengivais da cavidade bucal (SOCRANSKY et al., 1992). Sua presença na microbiota subgengival de indivíduos com gengivite é menor do que 5%, contudo, seu número aumenta drasticamente na doença periodontal em estágio avançado (GIBSON et al., 2006).

Segundo Rudney et al. (2001), a boca pode fornecer um modelo acessível para o estudo de interações bacterianas com células humanas *in vivo*. Utilizando hibridização fluorescente *in situ* e microscopia confocal de varredura a laser, os autores descobriram que as células epiteliais bucais humanas encontravam-se infectadas com bactérias intracelulares, incluindo os periodontopatógenos *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*. A invasão de células bucais pode permitir o estabelecimento de bactérias anaeróbias em locais de aerobiose que, em outros casos, apresentariam um ambiente desfavorável.

Yilmaz et al. (2006), desenvolveram um novo modelo *in vitro* para o estudo da dispersão de *Porphyromonas gingivalis* entre as células epiteliais gengivais. Os pesquisadores observaram que essa bactéria possuía a capacidade de se disseminar entre as células sem passar pelo espaço extracelular. Acredita-se também que consiga propagar-se pelas camadas de células epiteliais gengivais e podem ainda penetrar a membrana basal adentrando ao tecido conjuntivo. Gingipain, secretada por *P. gingivalis*, consegue degradar os componentes da matriz celular e das junções celulares, permitindo que a bactéria ultrapasse, desse modo, as barreiras de proteção formadas pelo tecido conjuntivo e pela adesão celular (ANDRIAN et al., 2004; TRIBBLE et al., 2010).

A periodontite em estágio avançado do adulto possui entre os principais agentes etiológicos a bactéria *Porphyromonas gingivalis* e seus fatores de virulência, como o lipopolissacarídeo, fímbrias, hemaglutininas, vesículas e as proteases (SLOTS et al., 1984).

Em sua maioria, *P.gingivalis* apresentam fimbrias distribuídas de modo peritricoso sobre a sua superfície. Há muitas evidências de que suas fimbrias participem da sua adesão ao tecido do hospedeiro, inclusive ao tecido bucal, devido a sua interação adesiva à citoqueratina (SOJAR et al., 2002). Além disso, essa bactéria possui a capacidade de se aderir aos microrganismos que já colonizaram a região periodontal (WHITTAKER et al., 1996).

2.4 Digluconato de Clorexidina

O digluconato de clorexidina é o antimicrobiano tópico de uso bucal mais efetivo, mais estudado, de amplo espectro, que age contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, leveduras, dermatófitos e alguns vírus lipofílicos (DUMITRESCU, 2011). Sua atividade em pH alcalino é melhor do que em pH ácido e mostra-se reduzida na presença de matéria orgânica, o que pode ser um problema devido ao seu uso em sítios subgengivais (SLOTS; 2002).

Como apresenta um potencial antimicrobiano eficaz, o digluconato de clorexidina foi utilizado em muitos cremes antissépticos para a pele, enxaguatórios bucais e desinfecção cutânea para execução de procedimentos cirúrgicos. Além disso, o digluconato de clorexidina ainda foi incorporado aos produtos cosméticos. No início de 1990, o FDA autorizou três tipos de dispositivos médicos que contenham essa substância em sua composição: cateteres intravenosos, antibióticos tópicos para a pele e em tecidos utilizados para implantação cirúrgica (FDA, 1998).

Sua aplicação na Odontologia teve início por Løe & Schiott (1970) e atualmente é formulada em diferentes produtos, como enxaguatórios bucais, géis, comprimidos, vernizes, chicletes, entre outros (DUMITRESCU, 2011). Os enxaguatórios bucais são comercializados como soluções, a base de água ou álcool, com concentrações que variam entre 0,12% e 0,2% (DUMITRESCU, 2011).

Essa substância exibe efeito bacteriostático quando utilizada em baixas concentrações e, em altas concentrações, bactericida (OOSTERWAAL et al., 1989). Essas atuações ocorrem, pois, em PH fisiológico, o digluconato de clorexidina é uma molécula dicatiônica grande, com carga positiva distribuída ao longo dos átomos de nitrogênio distribuídos em ambos os lados da ponte de hexametileno. Portanto,

possui a capacidade de adsorver as superfícies carregadas negativamente, como as paredes bacterianas, local em que age essa substância e consegue adsorver fortemente aos componentes contendo fosfato (DUMITRESCU, 2011).

O digluconato de clorexidina altera a integridade da membrana celular bacteriana e é atraída para o seu interior, onde se liga aos fosfolipídios no interior dessa membrana e induz o aumento da permeabilidade e o extravasamento de componentes com baixo peso molecular, como íons de potássio (KUYAKANOND et al., 1992). Esse antimicrobiano ainda se liga às diferentes superfícies bucais e também à saliva e à película. Após seu bochecho, a saliva obtém efeito antimicrobiano por até 5 horas (DUMITRESCU, 2011).

Apesar de ser amplamente utilizado na Odontologia para diferentes situações (DUMITRESCU, 2011), o digluconato de clorexidina pode apresentar efeitos colaterais como sabor desagradável, erosão em mucosa, sensação de queimação dos tecidos moles, dor e ressecamento dos tecidos bucais, lesões descamativas e, em alguns casos raros, reações de hipersensibilidade e hipertrofia de parótida (AUTIO-GOLD, 2008). Contudo, os efeitos colaterais mais conspícuos são coloração castanho amarelada da estrutura dental, língua e nas margens das restaurações, além das alterações em paladar (DUMITRESCU, 2011).

A alteração da coloração da estrutura dental por essa substância tende a ocorrer no terço cervical da coroa, nas áreas interproximais, apresentando exacerbação na área da junção amelocementária, na superfície radicular exposta, na língua, ou em sulcos e fissuras e, ocasionalmente, em restaurações de resina composta (AUTIO-GOLD, 2008). A alteração na coloração dos dentes ocorre em um terço a metade dos pacientes e é geralmente evidente dentro de alguns dias após o início do bochecho diário com essa substância. A mancha é removível, para isso uma profilaxia dentária profissional geralmente é necessária após o uso de enxaguatórios que contenham digluconato de clorexidina (AUTIO-GOLD, 2008). Os efeitos de coloração devem ser minimizados pela diminuição da ingestão de determinados alimentos e bebidas, como cafés e chás, durante o tratamento com a clorexidina (DUMITRESCU, 2011).

Muitos mecanismos foram propostos na tentativa de explicar a coloração causada pelo digluconato de clorexidina, como a degradação de sua molécula com a posterior liberação de paracloroanilina, catálise da reação de Maillard (reação

química entre proteínas e açúcares redutores que causa a formação de pigmentos marrons), desnaturação de proteínas com a formação de sulfeto de metal e a precipitação de cromógenos aniônicos da dieta (AUTIO GOLD, 2008; DUMITRESCU, 2010).

O digluconato de clorexidina pode ainda estar relacionado à ageusia e à hipogeusia, perda ou redução subjetiva do paladar, a qual se mostra associada, especificamente, ao sabor salgado ou amargo, portanto, a capacidade de reconhecer sabores doces ou cítricos não é modificada. Essa alteração no paladar perdura por alguns dias após a interrupção do uso de enxaguatórios bucais a base de digluconato de clorexidina (DUMITRESCU, 2011).

Alguns casos de reações de hipersensibilidade têm sido associados com o uso tópico de digluconato de clorexidina, intrauretral, como lubrificante em cateteres urinários e em cateteres impregnados de digluconato clorexidina (FDA, 1998; YONG et al., 1995). Na Austrália, houve seis casos de reações alérgicas severas ao gel desta substância utilizado em cateteres urinário (YONG et al., 1995). Em 1998, a U.S Food and Drug Administration publicou uma notificação alertando sobre o potencial deste composto em induzir reações de hipersensibilidade (FDA, 1998).

2.5 Fitoterapia: breve histórico

Há aproximadamente dez mil anos atrás, deu-se início à agricultura, considerada um evento histórico que revolucionou a cultura humana e sua relação com o meio ambiente. A utilização da agricultura permitiu que as pessoas utilizassem seu tempo livre para desenvolverem outras funções e com isso, civilizações Incas, Maias, Egípcias, Romanas, Chinesas, Gregas e do Oriente Médio foram gradualmente se desenvolvendo. Mediante essa evolução, foram desenvolvidos novos empregos para as plantas, que eram utilizadas de maneira empírica, dentre eles a sua utilização medicinal (PRANCE et al., 2005).

Em 1873, foi encontrado o “Papyrus Ebers”, data da época do Egito antigo, cerca de 1.600 a.C. Esse documento é considerado o tratado mais antigo de medicina egípcia sendo visto como um dos primeiros documentos com abordagem sobre a utilização das plantas medicinais (PELT, 1979).

A China tem sido um dos países mais importantes na pesquisa e utilização de fitoterápicos. Historicamente, a medicina fundamentada em plantas medicinais já era aplicada desde a época dos Estados Guerreiros (475-221 a.C.) e com o tempo ocorreram muitas descobertas de aplicações terapêuticas contra muitas doenças. A China ofereceu grandes exemplos da importância dessas plantas, como no caso da *Panax ginseng* (ginseng) e *Ginkgo biloba* (PEIXOTO NETO et al., 2005), os quais tem apresentado eficácia contra muitas alterações, dentre elas, respectivamente, a melhora da performance cognitiva e insuficiência cerebral (ALEXANDRE et al., 2008).

As plantas foram fonte de medicamentos, tintas, venenos e alucinógenos. Os povos da pré-história tinham que confiar em seus conhecimentos profundos acerca das plantas existentes em seus habitats para poderem explorar a flora de maneira eficaz e em seu benefício (PRANCE et al., 2005).

Na era Medieval, o médico suíço Paracelso ganhou destaque por descobrir inúmeras drogas utilizadas ainda nos dias atuais, dentre elas o ópio, obtido a partir de espécies de *Papaver somniferum*. Paracelso, entre outros feitos, popularizou o uso do ópio na medicina (PEIXOTO NETO et al., 2005; PRANCE et al., 2005).

No Brasil, durante os três primeiros séculos de colonização, até mesmo os portugueses, embora se tratassem com seus médicos, por vezes aproveitavam-se dos recursos de plantas medicinais utilizadas pelos indígenas, como a copaíba utilizada para a cura de feridas (EDLER, 2006).

O primeiro olhar sobre o Novo Mundo resultou em descrições históricas e literárias da nova terra reunidas em relatos, escritos, tratados e cartas dirigidas ao rei. Desse modo, os primeiros documentos que abordavam a flora e fauna do Brasil foram sendo produzidos por cronistas, missionários, como Frei Cristóvão de Lisboa, autor da História dos Animais e Árvores do Maranhão (escrita possivelmente entre 1624 e 1627), ou ainda por colonizadores (ALMEIDA, 2008).

A primeira descrição de algumas plantas usadas pelos indígenas no Brasil foi realizada durante uma missão científica, durante a ocupação holandesa (1630-1654) (PEIXOTO NETO, 2005). A partir das missões foram estabelecidas redes de comércio entre os diferentes continentes, estando os jesuítas presentes no negócio das especiarias, sedas e dos remédios (ALMEIDA, 2008).

Os missionários jesuítas aproveitaram da medicina indígena, tornando as plantas medicinais brasileiras mundialmente famosas. Pelas mãos dos jesuítas, a Triaga Brasília, uma panacéia composta de elementos da flora nativa datada de 1766 e encontrada na Collecção de Receitas do Colégio dos Jesuítas da Bahia, chegou a se tornar uma das principais fontes de renda da ordem jesuítica na Bahia (RIBEIRO, 1971).

As terras brasílicas revelavam um excelente aproveitamento medicinal de grande parte da sua exuberante natureza. O território brasileiro mostrava-se cada vez mais como um grande fornecedor de matéria médica exótica. Muitas das plantas, árvores e animais abundantes no Brasil serviam de antídoto contra as várias doenças que na época multiplicavam-se rapidamente. A maioria dos cronistas portugueses da época, particularmente os jesuítas, ofereceu atenção especial aos efeitos terapêuticos das várias espécies brasílicas, revelando-se frequentemente maravilhados com a grande utilidade médica das plantas brasileiras (SEIXAS, 2003).

O padre jesuíta Francisco Soares (1569-1567) em sua obra *Coisas notáveis do Brasil*, dá o seguinte título ao capítulo V: “Das ervas que Dioscórides não teve conhecimento nem fez menção, nem outros autores” e revela seu encantamento com a quantidade, variedade e potenciais das ervas medicinais existentes nas terras brasileiras (SEIXAS, 2003).

Os colonizadores, embora se mostrassem preconceituosos em relação aos elementos culturais indígenas, se interessaram em recolher informações sobre como os indígenas combatiam as doenças locais. Com isso, os colonizadores após observarem a utilização dessas plantas, experimentavam, descreviam as propriedades terapêuticas das novas espécies e seus usos, e divulgavam-nas na metrópole. Mais tarde, tal informação retornava à colônia em compêndios de farmacopeia, informando a atividade dos fitoterápicos (EDLER et al., 2005).

Em 1847, Theodor Peckolt chegou ao Brasil e analisou mais de 6.000 plantas, publicando os resultados desse estudo em mais de 150 artigos (GOTTLIEB et al., 1979). Embora muitas de suas análises sejam consideradas ultrapassadas pelos padrões atuais, ele influenciou centenas de outros trabalhos sobre a flora medicinal brasileira que o sucederam (PEIXOTO NETO, 2005).

Poucos são os trabalhos publicados por pesquisadores brasileiros quando comparados com publicações de outros países a respeito do assunto e tal fato contrasta com a riqueza da flora do país (GOTTLIEB, 1979). Os fatores que contribuem para este panorama são: quantidade insuficiente de pesquisadores interessados no assunto, falta de integração das diversas áreas da ciência, pouco suporte financeiro, entre outros (GOTTLIEB, 1997). Em adição, a indústria farmacêutica mostra pouco interesse no desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de doenças que acometam os países tropicais (DE MOURA et al., 2001).

Entretanto, a natureza não é apenas como uma fonte de moléculas bioativas, pois, com as constantes devastações há a extinção de espécies e a perda de inúmeras estruturas químicas biossintetizadas sem que se tome conhecimento delas. Contudo, é necessário um mapeamento e quantificação da biodiversidade, para que se possa ultrapassar o simples isolamento de um novo princípio ativo e permitir o uso da mesma de maneira sustentável (GOTTLIEB, 1997).

2.6 Copaíba: histórico, aplicações e aspectos gerais

Frei Vicente do Salvador, em um relato de 1627, faz menção a algumas árvores muito grossas e altas chamadas copaíbas, que golpeadas ou furadas no tempo do estio gotejam do seu interior um precioso óleo, utilizado na cura de muitas enfermidades e no tratamento de quaisquer chagas, principalmente de feridas.

As copaibeiras aguçaram o interesse de viajantes, freis jesuítas e historiadores, desta maneira, desde os primeiros anos de descobrimento, devido às suas observações, tal planta vem sendo indicada para diversos fins farmacológicos (PIERI et al., 2009).

Dwyer, em 1951, relatou diferentes usos pelas populações amazônicas do óleo, dentre eles o seu emprego em infecções de garganta, em feridas, hematomas, estimulante de apetite e, antes da descoberta de drogas mais efetivas, era utilizado na América Tropical para o tratamento de hemorroidas e gonorreia.

O óleo de copaíba é um fitoterápico muito utilizado pelos amazonenses, isso é verificado quando se analisa que, somente na cidade de Belém, as vendas do óleo

de andiroba e de copaíba combinadas atingiram dez mil litros no ano de 1994 e o triplo disso em 2002 (LOPEZ et al., 2008).

As copaíbas são árvores nativas da América Latina e África Ocidental (DWYER, 1951; PIERI et al., 2009). Há citação de uma espécie encontrada na Ilha de Bornéu, na Malásia, chamada de *Copaifera palustris*, que apresenta características bastante semelhantes as das espécies africanas (HOU, 1994). Na América Latina são encontradas espécies na região que abrange desde o México ao norte da Argentina (DWYER, 1951; VEIGA JUNIOR et al., 2002). No Brasil, essas árvores estão localizadas principalmente nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Amazônica (PIERI et al., 2009; VEIGA JUNIOR et al., 2002).

O nome copaíba tem origem tupi “cupa-yba” e é relacionada à árvore que contém depósito, ou que tem jazida, em alusão ao óleo que guarda em seu interior. No Brasil são popularmente conhecidas como copaibeiras, pau d’óleo, copaíba, copaúva, copai (CASCON, 2004), copaibarana, copaibo, copal e marimari. Seu óleo é chamado de bálsamo ou óleo de copaíba. Nos demais países da América Latina, denomina-se a árvore principalmente como “palo-de-bálsamo”. A denominação do óleo-resina em inglês é “copaiba balsam” e do óleo volátil, “copaiba oil”. Em francês a árvore é denominada “copayer”, a óleo-resina, “baume de copayer” e o volátil, “huile de copayer” (CASCON, 2004; PIERI et al., 2009).

No território brasileiro encontra-se mais de vinte espécies da planta (DWYER, 1951). Entre as mais abundantes estão a *C. officinalis* L., *C. guianensis* Desf., *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne, *C. confertiflora* Bth., *C. langsdorffi* Desf., *C. coriacea* Mart. e *C. cearensis* Huber ex Ducke (VEIGA JUNIOR et al., 2002). O gênero *Copaifera* possui 72 espécies catalogadas na edição de 1996 do livro *Index Kewensis* e segundo estudos de Dwyer (1951), dezesseis espécies são encontradas exclusivamente no Brasil, sendo que o óleo extraído pode variar em relação à concentração e natureza dos diterpenos e sesquiterpenos presentes de acordo com variações de espécies (PIERI et al., 2009).

A região Amazônica contém uma grande quantidade destas espécies, das quais todas apresentam muitas similaridades, principalmente, com relação ao tamanho da árvore (ROSA et al., 2009). A ocorrência dessas plantas abrange diferentes habitats, desde matas de solos firmes, margens inundáveis de igarapé ou rios, terrenos argilosos, matas de cerrado da região central do país até, em alguns

casos, terrenos arenosos (ALENCAR, 1981; ROSA, 2009). Em regiões com período de seca prolongado, a ocorrência dessa árvore torna-se rara ou ocasional (ROSA et al., 2009). A distribuição da copaíba abrange desde o médio Tapajós até a Amazônia Ocidental (Amazonas, Acre e Rondônia), contudo apresenta-se ainda nas regiões sul de Roraima, norte de Mato Grosso, Minas Gerais, Piauí, Bahia, Ceará e, em pequena quantidade, nas demais regiões do Brasil (PIERI et al., 2009; ROSA et al., 2009; VEIGA JUNIOR et al., 2002).

Essas plantas, segundo classificação botânica, pertencem à família Leguminosae, subfamília Caesalpinoideae e gênero *Copaifera* (CASCON, 2004; ROSA et al., 2009; VEIGA JUNIOR et al., 2002). Em alguns casos, podem viver por até 400 anos e possuem, como característica, altura entre 25 e 40 metros (VEIGA JUNIOR et al., 2002), casca aromática, madeira pesada, folhagem densa, flores pequenas e frutos secos, do tipo vagem (ALENCAR, 1981). Suas sementes são pretas e ovóides, com um arilo amarelo rico em lipídeos (ALENCAR, 1981; DWYER, 1951). A sua casca mostra uma coloração castanho-escuro, superfície rugosa, com aroma característico e agradável, sendo que o diâmetro do tronco, apesar de poder chegar aos 80 centímetros, geralmente varia de 40 a 50 centímetros (ALENCAR, 1981; ROSA et al., 2009; VEIGA JUNIOR et al., 2002).

Do tronco extrai-se um óleo, cuja coloração varia do amarelo ao marrom, com propriedades medicinais (PEDREIRA, 2007; PIERI et al., 2010a, PIERI et al., 2010b). Apresenta folhas pinadas, podendo apresentar pontuações visíveis à transparência e cheias de glândulas contendo óleo resinoso (ALENCAR, 1981; ROSA et al., 2009).

As folhas, quando recém-brotadas, mostram tonalidades avermelhadas revestindo toda a copa (ROSA et al., 2009). As flores são sésseis, pequenas, brancas, apétalas, hermafroditas e de cálice vermelho ferrugíneo (ALENCAR, 1981; ROSA et al., 2009; VEIGA JUNIOR et al., 2002).

A identificação botânica da árvore é difícil, sendo, muitas vezes, realizada devido às características das flores, como pelos nas sépalas, comprimento dos anteros e a condição glabrosa ou não do pistilo (DWYER, 1951). As características dos frutos são também relevantes, contudo esses são dificilmente encontrados em coleções botânicas (DWYER, 1951).

Apesar do grande acervo na literatura sobre o óleo de copaíba, poucas referências citam a identificação botânica da espécie de *Copaifera* estudada, o que impossibilita a comparação de resultados entre os diferentes trabalhos realizados (VEIGA JUNIOR et al., 2002).

O óleo-resina extraído da copaibeira apresenta diversas indicações na medicina tradicional e tem sido, há vários anos, matéria de muitos estudos, os quais visam comprovar a eficiência e adaptar o uso dessa planta. No Brasil, óleo de copaíba tem sido estudado como importante fitoterápico (PEDREIRA, 2007; PIERI 2010a; PIERI et al., 2010b).

Os principais efeitos descritos são: anti-inflamatório (DWYER, 1951; RAMOS, 2006; VEIGA JUNIOR et al., 2002), analgésico (PENNAFORTE, 2003), antisséptico (CASCON, 2004; RAMOS, 2006; VEIGA JUNIOR et al., 2002), cicatrizante (PIERI et al., 2009; VEIGA JÚNIOR et al., 2002), antibacteriano, (PIERI et al., 2010a; PIERI et al., 2010b) expectorante (RAMOS, 2006) e antitumoral (PEDREIRA, 2007).

Na Odontologia, pesquisas recentes têm demonstrado que o óleo de copaíba apresenta ação antimicrobiana contra as bactérias formadoras do biofilme (PIERI et al., 2010a). Testes foram empreendidos utilizando o cimento produzido a partir de óxido de zinco e eugenol, utilizado para adequamento do meio bucal. Nesse experimento eugenol foi substituído pelo óleo de copaíba devido à baixa toxicidade. O cimento alterado, obtido a partir da associação do ZnO, Ca(OH)₂ e óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne, manteve ou mesmo melhorou as suas propriedades e mostrou ainda ação antimicrobiana, realizada através do teste de diluição em meio líquido, frente às cepas padrão de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *S. sanguinis* (ATCC 15300) (VASCONCELOS et al., 2008).

Um estudo, realizado na Universidade Federal do Amazonas, comparou a biocompatibilidade de um cimento experimental (Cop Endo) contendo óleo-resina de copaíba com três cimentos endodônticos disponíveis no mercado (Endofill, Sealer 26 e AH-Plus). O procedimento experimental consistiu em um teste secundário para avaliação da compatibilidade tecidual *in vivo*. Concluiu-se que apesar de todos os materiais testados mostrarem-se irritantes, o cimento obturador a base de copaíba (Cop Endo) mostrou ser menos agressivo (GARRIDO, 2004).

Os eventos adversos relatados pelo uso do óleo de copaíba têm se mostrado leves ou ausentes (SOARES et al., 2006). A agência americana Food and Drug Administration (FDA) classificou e regulamentou a utilização do óleo de copaíba, assegurando que essa substância pode ser utilizada de maneira segura desde que seguida às recomendações da agência (FDA, 2010).

Além da importância do óleo-resina para o tratamento de doenças, as espécies do gênero *Copaifera* apresentam características em sua madeira que são muito difundidas na construção civil (VEIGA JUNIOR et al., 2002) pois é durável, exibe alta resistência ao ataque de fungos e microrganismos e dispõe de resistência ao encharcamento por água (RIGAMONTE-AZEVEDO et al. 2004).

O óleo de copaíba tem sido utilizado há muito tempo pelas populações amazônicas, contudo suas funções estendem-se além das utilidades medicinais, abrangendo estudos de outras diversas funções como secativo na indústria de vernizes (CASCON, 2004; RAMOS, 2006; RIGAMONTE AZEVEDO et al., 2006), solventes em pinturas de porcelanas (VEIGA JUNIOR et al., 2002), aditivo na confecção de borracha sintética (PIERI et al., 2009), aromatizante de alimentos aprovado pelo Food and Drug Administration (CASCON, 2004), na indústria de cosméticos (CASCON, 2004; RAMOS, 2006), na fabricação de cremes, sabonetes, xampus e amaciantes de cabelos (CASCON, 2004).

O óleo extraído pode variar em relação à concentração e natureza dos diterpenos e sesquiterpenos presentes de acordo com variações de espécies, estações do ano e fatores biológicos como insetos e fungos (RAMOS, 2006), embora alguns estudos com *Copaifera duckei* não tenham apresentado diferença significativa na composição de óleos extraídos das mesmas árvores, em épocas sazonais diferentes (PIERI et al., 2009).

O óleo de copaíba é solúvel em álcool absoluto, o qual é empregado como teste para detectar adulteração do óleo de copaíba por óleo graxo. Embora o teste da solubilidade em etanol possa ser útil se for utilizado em conjunto com outras observações, ele não apresenta resultados conclusivos (VASCONCELOS et al., 2002).

2.7 Melaleuca: histórico, aplicações e aspectos gerais

Há muito tempo, antes da chegada dos europeus em suas terras, a população indígena da Austrália utilizava o extrato da árvore melaleuca para o tratamento de infecções cutâneas (BARCELOUX, 2008). A história dos aborígenes australianos descreve ainda a crença em lagos ou lagoas que possuíam a capacidade de cura, os quais continham as folhas de *Melaleuca alternifolia* que haviam caído das árvores (ALTMAN, 1988).

A produção comercial do óleo de melaleuca na Austrália teve início em 1920, pois o uso do óleo em si tornou-se prática comum apenas após os primeiros relatos de sua atividade antimicrobiana em uma série de trabalhos publicados por Penfold (CARSON et al., 2006; PENFOLD et al., 1925). Essas pesquisas sugeriam que o óleo extraído dessa árvore apresentava um agente antibacteriano mais eficaz que o fenol, principal agente antibacteriano da época (BARCELOUX, 2008).

Segundo Carson et al.(1993), devido à destilação ser o processo utilizado para extrair o óleo das folhas de *M. alternifolia*, é pouco provável que esta parte da planta tenha sido usada pelos aborígenes australianos.

Por muitas décadas, o óleo de melaleuca foi produzido através do corte manual da planta seguido pelo processo de destilação em alambiques (BARCELOUX, 2008). MacDonald (1930) publicou em um jornal australiano de Odontologia um artigo em que o óleo de melaleuca foi enaltecido e sua qualidade antisséptica ressaltada.

Durante a década de 1930, alguns médicos australianos começaram a documentar o uso do óleo durante a prática profissional (CARSON et al., 1993). Penfold et al. (1937) relataram várias condições que haviam respondido à aplicação do óleo de melaleuca, como cicatrização de feridas, paroníquia (infecção na pele adjacente à unha), empiema, doenças ginecológicas, epidermofitose, condições de impetigo contagioso, micose e doenças envolvendo a região de garganta e boca.

Contudo, em meados da década de 1940, a produção do óleo começou a declinar devido à disponibilidade de antibióticos. Nas décadas de 1970 e 1980, os produtos naturais voltaram a se tornar mais populares, portanto, plantações de árvores de melaleuca tornaram-se cultivadas na Austrália Ocidental, Nova Gales do

Sul e Queenslândia, os quais produziram o óleo essencial após extração através de cortes e lascas da planta (BARCELOUX, 2008).

O gênero *Melaleuca* pertencente, à família Myrtaceae e abrange aproximadamente 230 espécies, a maioria nativa da Austrália e Ilhas do Oceano Índico (BARCELOUX, 2008; CARSON et al., 2006). Embora *Melaleuca alternifolia* seja a principal fonte comercial de óleo de melaleuca, a hidrodestilação de outras espécies de melaleuca também podem produzir óleos semelhantes, incluindo: *M. linariifolia*, *M. dissitiflora*, *M. uncinata*, *M. cajuputi* e *M. quenervia* (BARCELOUX, 2008).

Podem atingir de 5 a 8 metros de altura e exibem folhas longas, estreitas, pontiagudas e alternas (PEREIRA, 1857; WHO, 2002). Suas flores são sésseis, com espinhos e com coloração branca, amarelada ou arroxeada (PEREIRA, 1857). Essas plantas são usadas principalmente na fabricação de cosméticos, germicidas, agentes antissépticos, carminativos e no tratamento de várias doenças (FARAG, 2004).

Essa árvore é usualmente conhecida como "tea tree", "Australian tea tree" e "árvore do chá" (PASTERNAK, 2008; WHO, 2002), embora esses nomes também sejam utilizados para denominação das muitas outras espécies do gênero *Melaleuca* (CARSON et al., 1993). Aetheroleum Melaleucae Alternifoliae é o óleo essencial obtido a partir da destilação a vapor das folhas e ramos terminais da *Melaleuca alternifolia* (WHO, 2002). Mesmo a designação "tea tree oil" mostra-se potencialmente ambígua, uma vez que vários óleos quimicamente distintos são destilados a partir de outras espécies de melaleuca (CARSON, 2006).

Apesar de *Melaleuca alternifolia* ser uma árvore nativa da Austrália (BARCELOUX, 2008; WHO, 2002), quatro espécies são cultivadas como espécimes botânicos em alguns jardins no Egito (FARAG et al., 2004).

No Brasil, a produção ainda é inexpressiva obrigando as indústrias de cosméticos e casas de produtos naturais a adquirirem o produto mediante importação, ocasionando no repasse final ao consumidor de um produto (cosmético, farmacêutico e de higiene pessoal) com valores agregados. A baixa produção brasileira está relacionada a vários fatores como a ausência de informações técnicas relacionadas à produção de mudas da espécie (CASTRO et al., 2005).

Plantas do gênero *Melaleuca* são ricas em óleos voláteis (CARSON, 2006; HAMMER et al., 2003). O óleo de melaleuca é composto por hidrocarbonetos terpênicos, principalmente monoterpenos e sesquiterpenos, álcoois e seus componentes. Os terpenos são hidrocarbonetos aromáticos, voláteis e podem ser considerados polímeros de isopreno (BROPHY, 1989; CARSON et al., 2006).

Brophy et al. (1989) analisaram mais de 800 amostras de óleo de melaleuca relatando cerca de 100 componentes e seus coeficientes de variação. O óleo de melaleuca é moderadamente solúvel em água, miscível com solventes apolares (ISO, 2004; CARSON et al., 2006) e solúvel em álcool a 20°C (WHO, 2002). Soluções aquosas do óleo podem ser obtidas adicionando-se agentes emulsificantes tradicionalmente utilizados pela indústria de cosméticos como o Tween 20 ou Tween 80, os quais não interferem nas propriedades antimicrobianas do óleo (RAMACCIATO, 2000).

Alguns componentes do óleo de melaleuca tem previamente mostrado propriedades antibacterianas, antifúngicas e anti-inflamatórias (*in vivo*), como o terpinenol (terpinen-4-ol) e o α -terpineol, isoladamente ou sinergicamente com um ou mais componentes menores (HART et al., 2000; PENFOLD et al., 1925). Em 1985, foi criada uma norma de qualidade para óleos de melaleuca na Austrália, que em 1996 foi revisada e adotada como padrão internacional (BROPHY, 1989; KHAN et al., 2010). O padrão australiano e a OMS exigem que óleo contenha quantidades de 1,8-cineol abaixo de 15% e de terpinen-4-ol acima de 30%. O terpinen-4-ol é encontrado em várias espécies de melaleuca (*M. alternifolia*, *M. dissitiflora* e *linariifolia* M.). O óleo deve conter ainda quantidade de sabineno superior a 3,5%, 1 a 6% de α -terpineno; 10 a 28% γ -terpineno; 0,5 a 12% β -cimeno e 1,5 a 8% de α -terpineol, mensurados por cromatografia gasosa (WHO, 2002; KHAN et al., 2010).

O óleo de melaleuca não mancha, tem boas propriedades de penetração tecidual, é compatível com sabões, sendo considerado um solvente poderoso (RAMACCIATO, 2000). As pesquisas realizadas abrangem diversas utilizações como aplicação tópica para o tratamento sintomático de doenças de pele comuns (WHO, 2002), tais como acne (BASSETT et al., 1990), tinea pedis ("pé-de-atleta") (BASSETT et al., 1990), oníchia micótica (WHO, 2002), antisséptico e desinfetante para o tratamento de feridas (REYNOLDS, 2008), queimaduras (BOLES et al., 2008), atividade antibacteriana (BANES-MARSHALL et al., 2001; CARSON et al.,

1993; CARSON et al., 2006; COX et al., 2000), antifúngica (BANES-MARSHALL et al., 2001; COX et al., 2000), antiviral (GAROZZO et al., 2011), anti-inflamatória (HART et al., 2000) e antitumoral (GREAY et al., 2010). Existem também dados descritos na medicina popular, sem confirmações experimentais ou clínicas, no tratamento de colites, tosses, resfriados, impetigo, psoríase, congestão nasal, amigdalite (WHO, 2002). Jandourek et al. (1998), durante uma pesquisa clínica, avaliaram a eficácia de uma solução oral a base de óleo de melaleuca para o tratamento de candidose orofaríngea refratária ao fluconazol em 13 pacientes portadores de HIV. Os pacientes fizeram uso de 15 mL de uma solução de melaleuca, por meio de bochecho e gargarejo, quatro vezes ao dia, durante duas a quatro semanas. Os pesquisadores concluíram que a solução pode ser um tratamento alternativo para esta patologia.

COX et al. (2000), realizaram experimentos com o objetivo de analisar o mecanismo de ação do óleo de melaleuca quando aplicado à *Escherichia coli* (AG100), *Staphylococcus aureus* (NCTC 8325) e a *Candida albicans*. Os pesquisadores relataram que quando expostos as suas respectivas concentrações inibitórias mínimas e concentrações bactericidas/fungicidas mínimas, ocorria inibição da respiração e o aumento da permeabilidade no citoplasma bacteriano e na membrana plasmáticas de leveduras. As bactérias testadas, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sofreram ainda efluxo de íons de potássio devido ao contato com o óleo.

A evidência de quase 80 anos de uso do óleo de melaleuca sugere que o seu uso tópico é relativamente seguro e que os efeitos adversos são ínfimos e ocasionais (HAMMER et al., 2006). Contudo alguns dados publicados indicam que o óleo é tóxico se ingerido em doses elevadas (CARSON et al., 2006; HAMMER et al., 2006) e pode ainda causar irritação na pele quando utilizado em altas concentrações (CARSON et al., 2006).

As reações alérgicas ocorrem em indivíduos pré-dispostos, possivelmente devido aos vários produtos de oxidação formados pela exposição do óleo à luz e/ ou ao ar (HAMMER et al., 2006). As reações adversas podem ser minimizadas evitando a ingestão, aplicando somente o óleo diluído por via tópica e com o adequado armazenamento do produto (HAMMER et al., 2006). Segundo o Scientific Committee on Consumer Products (2004), apenas um estudo inadequado sobre a

genotoxicidade foi fornecido, portanto, nenhuma conclusão definitiva pode ser relacionada à mutagenicidade e carcinogenicidade.

Jacobs et al. (1994) descreveram um caso de intoxicação de um menino de 1 ano e 11 meses, o qual apresentava confusão mental e impossibilidade de locomoção, 30 minutos após a ingestão de uma quantidade inferior a 10 mL de óleo de melaleuca puro. A criança foi encaminhada para um hospital próximo e encontrava-se assintomática 5 horas após a ingestão.

A ingestão, de cerca de metade de um copo (120 ml) de óleo de melaleuca por um paciente, acarretou na indução de um estado de coma com duração de 12 horas, seguido de 36 horas de um estado semiconsciente, acompanhado de alucinações. Dor abdominal e diarreia com duração de até 6 semanas também foram descritas (SEAWRIGHT, 1993). Nenhuma morte humana relacionada ao óleo de melaleuca foi relatada na literatura (CARSON et al., 2006).

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

A partir de testes in vitro realizados com digluconato de clorexidina e óleos de copaíba e de melaleuca sobre *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*, propôs-se:

- ✓ Contribuir para o estudo sobre as propriedades antimicrobianas dos óleos de copaíba e de melaleuca sobre *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*;

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar a Concentração Inibitória Mínima dos óleos de copaíba e de melaleuca sobre as cepas de *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*;
 - ✓ Determinar a Concentração Bactericida Mínima das soluções sobre *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*;
 - ✓ Verificar a capacidade de coagregação e autoagregação das cepas estudadas frente ao tratamento com concentrações subinibitórias das soluções testadas.
-
-

4 MATERIAL E MÉTODOS

A decorative wavy line in black ink, starting from the left side of the page, curving upwards and then downwards, ending on the right side.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Análises físico-químicas e cromatográficas dos óleos de copaíba e melaleuca

O óleo de copaíba utilizado nos ensaios foi adquirido da empresa Opção Fênix Distribuidora de Insumos Farmacêuticos. O óleo utilizado é proveniente de *Copaifera officinalis*. Este óleo foi submetido à avaliação relativa à presença de microrganismos, análise físico-química e cromatográfica. O laudo enviado pela empresa continha análises microbiológicas e organolépticas. As análises microbiológicas envolveram ensaios acerca da presença de *Pseudomona aereginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, os quais se mostraram ausentes, e a contagem total de bactérias, bolores e leveduras, os quais se revelaram dentro dos padrões especificados. Todas as análises microbiológicas estavam de acordo com Farmacopeia Brasileira.

A análise organoléptica do óleo de copaíba revelou coloração castanho-escura, líquido viscoso e odor característico. Os testes físico-químicos revelaram valor de densidade (25 °C) de 0,928 g/cm³, índice de acidez de 32,7 mgKOH/g, índice de saponificação de 113,25 mg KOH/kg, índice de refração de 1,4925, teor de essência de 40%, índice de iodo de 88 Wijs, índice de peróxido de 0,2meq/kg e ausência de terebentina e de óleos de parafina. Os resultados se mostraram dentro dos padrões especificados para confirmação de autenticidade do óleo de copaíba (VASCONCELOS et al., 2002; BIAVATTI et al., 2006).

O óleo de melaleuca utilizado nos ensaios foi adquirido da empresa Berjé Inc. O óleo utilizado é proveniente de *Melaleuca alternifolia*. O laudo enviado pela empresa continha análises organolépticas, as quais revelavam aspecto líquido límpido, incolor, odor característico, densidade (20 °C) de 0,892 g/mL, índice de refração (20 °C) de 1,4777 e rotação óptica específica de 8,96. Todos os resultados encontravam-se dentro dos padrões exigidos (ISO, 2004).

As amostras dos óleos sofreram identificação de seus analitos através da análise qualitativa por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. Para o preparo da amostra, foram pesados 100 mg de cada óleo em balão

volumétrico de 5 mL e solubilizados com acetato de etila. Injetou-se então 1 µL no cromatógrafo. O gás de arraste utilizado foi o Hélio, com vazão de 1 mL/min. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo a gás (6890, Hewlett Packard) acoplado a um detector seletivo de massas (5975, Hewlett Packard). Foi utilizada uma coluna (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (5MS, Hewlett Packard).

O digluconato de clorexidina foi obtido a partir da Deg, importadora de Produtos Químicos Ltda.

4.2 Preparo das soluções a base de *Copaifera officinalis* e *Melaleuca alternifolia*

Para possibilitar a solubilização dos óleos testados ao meio de cultura, foram realizados testes de solubilidade com os seguintes reagentes: Tween 20, Tween 80, álcool e dimetilsulfóxido (DMSO). Dentre essas substâncias, o Tween 80 obteve comportamento mais estável, pois manteve os óleos solúveis por um período prolongado, o que o torna eficiente devido à necessidade de solubilização dos óleos nos meios de cultura por um longo período. A concentração utilizada em todos os experimentos de Tween 80 foi de, no máximo, 5 µL/mL da concentração final do meio de cultura acrescido ou não das substâncias testadas. Os testes de solubilidade abrangeram os meios de cultura líquidos e a confecção de placas com meios de cultura sólidos. Essas placas continham, por vezes, os óleos testados e Tween 80. Quando concentrações mais elevadas dos óleos de melaleuca ou de copaíba são utilizadas em meio de cultura líquido ou em água, esses se tornam turvos e esbranquiçados, inviabilizando a leitura baseada na turbidez, tanto visual quanto por espectrofotômetro, como mostra a figura 1.

Todo Tween 80 utilizado durante o experimento foi previamente autoclavado e a solução de digluconato de clorexidina filtrada em filtro de millipore de 0,22 µm (Biofil).

Figura 1 – Tubo de ensaio contendo água acrescida de óleo de copaíba a 100 μ L/mL.

4.3 Microrganismos

Foram utilizadas cepas de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) e *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), obtidas a partir do Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo.

As culturas bacterianas criopreservadas a -80 °C foram inoculadas em meio ágar Brucella (Acumedia), suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro (New Prov), 0,2% de extrato de levedura (Acumedia), 5 μ g/mL de solução de hemina (Sigma) e 1 μ g/mL de solução de vitamina K (Sigma), seguindo-se incubação em câmara de anaerobiose (Plas Lab) em atmosfera de 85% N₂, 5% CO₂ e 10% H₂ à temperatura de 37 °C, por 4 dias. Após o desenvolvimento de colônias bacterianas, elas foram transferidas para tubos contendo 10 mL de Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) (Acumedia) suplementado com 0,6% de extrato de levedura, 5 μ g/mL de hemina e 1 μ g/mL de vitamina K. Após três dias de incubação em anaerobiose, alíquotas de 100 μ L destas culturas foram transferidas para um novo tubo contendo 10 mL do caldo BHI suplementado. Seguiu-se incubação em atmosfera de anaerobiose, por 16 horas.

4.4 Padronização do inóculo

Foi determinado o número de UFC e sua relação com a densidade óptica (DO) das culturas desenvolvidas como descrito nesse item. Após mensuração da DO em espectrofotômetro (JENWAY) ajustado a 560 nanômetros, a suspensão de células bacterianas foi ajustada a $DO_{560} \sim 0,7$.

A seguir, a cultura foi diluída em série em PBS (pH 7,0), alíquotas de cada uma das diluições foram semeadas em duplicata em placas contendo ágar Brucella suplementado com hemina, vitamina K, sangue desfibrinado de carneiro e extrato de levedura, e espalhadas com auxílio da alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 37 °C, em câmara de anaerobiose, por 72 horas para a posterior contagem das colônias bacterianas no contador manual (Tecnalise).

4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das soluções testadas

As concentrações inibitórias mínimas de cada substância foram determinadas pelo método de diluição em ágar, preconizado por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), o qual recomenda a técnica para todas as bactérias anaeróbicas. Esse método permite uma interpretação e leitura de resultados mais simples quando comparadas ao método de diluição em caldo (CLSI, 2007).

As placas foram preparadas com o meio ágar Brucella, suplementado com 5 µg/mL de hemina, 1 µg/mL de vitamina K; 0,2 % de extrato de levedura e 5% de sangue desfibrinado de carneiro adicionado às diferentes concentrações das duas substâncias testadas (óleo de copaíba e óleo de melaleuca). Placas contendo diferentes concentrações de digluconato de clorexidina foram preparadas como controle positivo. Também foram utilizadas, como controle, placas contendo apenas o veículo (Tween 80) sem adição da substância ativa ao meio de cultura. Como controle negativo foi utilizado apenas o meio de cultura sólido. O teste foi realizado em duplicata.

As placas foram preparadas a partir de ágar Brucella suplementado, seguindo as concentrações adequadas para cada substância (Tabela 1), a partir de soluções de estoque (Figura 2).

Figura 2 – Soluções de estoque de óleos de copaíba, melaleuca e de digluconato de clorexidina.

Tabela 1 - Meios de cultura preparados com as soluções ativas (quantidades para duas placas de Petri)

Substância ativa (concentração)	Quantidade da substância (mL)	Meio (mL)	Água (mL)	Sangue (mL)
Copaíba 100 µL/mL	5,25 de C1	42,25	-	2,5
Copaíba 20 µL/mL	1 de C2	42,25	4,24	2,5
Copaíba 2 µL/mL	1 de C3	42,25	4,25	2,5
Copaíba 0,2 µL/mL	1 de C4	42,25	4,25	2,5
Melaleuca 20 µL/mL	1 de M1	42,25	4,25	2,5
Melaleuca 2 µL/mL	1 de M2	42,25	4,25	2,5
Melaleuca 0,2 µL/mL	1 de M3	42,25	4,25	2,5
Melaleuca 0,02 µL/mL	1 de M4	42,25	4,25	2,5
Clorexidina 200 µg/mL	0,5 de X1	42,25	4,75	2,5
Clorexidina 20 µg/mL	0,5 de X2	42,25	4,75	2,5
Clorexidina 2 µg/mL	0,5 de X3	42,25	4,75	2,5
Clorexidina 0,2 µg/mL	0,5 de X4	42,25	4,75	2,5
Clorexidina 0,02 µg/mL	0,5 de X5	42,25	4,75	2,5
Clorexidina 0,002 µg/mL	0,5 de X6	42,25	4,75	2,5

Nota: Siglas e sinais utilizados:

-	Ausência da substância
C1 e M1	Respectivamente, óleo de copaíba e melaleuca acrescido apenas de Tween 80
C2 e C3	Respectivamente, óleo de copaíba na concentração de 100 µL/mL e 10 µL/mL
M2, M3 e M4	Respectivamente, óleo de melaleuca na concentração de 100 µL/mL, 10 µL/mL e 1 µL/mL
X1, X2, X3, X4, X5 X6	Soluções de digluconato de clorexidina nas concentrações de 20 mg/mL; 2 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,02 mg/mL; 0,002 mg/mL; 0,0002 mg/mL.

As placas foram inoculadas com suspensão padronizada de *P. gingivalis* e de *F. nucleatum*, como descrito no item 4.4, correspondendo a 1×10^7 UFC/mL. Alíquotas de 10 µL de cada suspensão bacteriana foram inoculadas na superfície do ágar com auxílio de pipeta multicanal, de maneira que cada placa continha 4 gotas de *Fusobacterium nucleatum* e 4 gotas de *Porphyromonas gingivalis* (Figura 3).

Figura 3 – Placa de ágar Brucella suplementado demonstrando a distribuição das gotas (10 μ L) dos inóculos, onde o amarelo representa *Fusobacterium nucleatum* e o verde *Porphyromonas gingivalis*. A seta foi utilizada para a identificação das bactérias.

Todas as placas foram incubadas em câmara de anaerobiose por 72 horas a 37 °C, seguindo-se a leitura visual. As menores concentrações de cada um dos agentes antimicrobianos testados que corresponderam à ausência do crescimento bacteriano foram consideradas as concentrações inibitórias mínimas de cada agente. O experimento foi feito em duplicata.

4.6 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) das soluções testadas

Visando determinar se a atividade antibacteriana das diferentes concentrações das soluções antimicrobianas testadas foi bactericida ou bacteriostática, foi determinada a concentração bactericida mínima.

Foram preparados tubos de caldo BHI suplementados com hemina e vitamina K. Estes tubos foram acrescidos de concentrações iguais e maiores à CIM de cada uma das substâncias, determinado no item 4.5.

Para a determinação da CBM da bactéria *F.nucleatum*, foi adicionado 100 µL do inóculo aos tubos de ensaio contendo:

- ✓ 200 µg/mL e 20 µg/mL de digluconato de clorexidina
- ✓ 140 µL/mL, 120 µL/mL e 100µL/mL de óleo de copaíba
- ✓ 100 µL/mL, e 20 µL/mL de óleo de melaleuca

Para a determinação da CBM da bactéria *P.gingivalis*, adicionou-se 100µL do inóculo aos tubos de ensaio contendo:

- ✓ 200µg/mL e 20µg/mL de digluconato de clorexidina
- ✓ 100 µL/mL, 20 µL/mL e 2 µL/mL de óleo de copaíba
- ✓ 100 µL/mL, e 20 µL/mL e 2 µL/mL de óleo de melaleuca

Como controle, para as duas bactérias, foram preparados tubos contendo apenas BHI suplementado e tubos contendo meio acrescido de Tween 80 nas seguintes concentrações: 5 µL/mL; 0,5 µL/mL; 0,05 µL/mL. Como controle negativo foram feitos tubos contendo apenas o meio de cultura.

Os tubos foram incubados em câmara de anaerobiose a 37 °C sob agitação leve em plataforma agitadora para homogeneização das substâncias em óleo. Após 16 horas, todos os tubos foram centrifugados, 2500 x g a 10 °C (Centrifuge 5804R, Eppendorf). O sobrenadante foi dispensado e as células bacterianas foram ressuspensas em 1 mL de caldo BHI. Alíquotas de 100 µL de cada tubo foram inoculadas em placas de ágar Brucella suplementado e espalhadas com auxílio da alça de Drigalski.

Após 72 horas de incubação em câmara de anaerobiose a 37 °C, as placas foram analisadas visualmente. A CBM correspondeu a menor diluição que matou mais de 99,9% das bactérias (não apresentando crescimento algum na placa referida). Todo experimento foi realizado em duplicata.

4.7 Determinação do efeito das substâncias testadas em Concentração Subinibitória sobre a autoagregação e coagregação de *P. gingivalis* e *F. nucleatum*

Este ensaio visou determinar a influência das concentrações subinibitórias (CS) das três substâncias testadas (digluconato de clorexidina, óleos de melaleuca e de copaíba) no processo de coagregação entre *F.nucleatum* e *P.gingivalis* e de autoagregação destas bactérias.

4.7.1 Determinação da Concentração Subinibitória

As Concentrações Subinibitórias (CS) foram determinadas segundo o protocolo utilizado por Cai (1994). Alíquotas de 100 µL de cultura de *P. gingivalis* ou *F. nucleatum* correspondentes a 1×10^9 UFC/ml foram inoculadas em tubos contendo 9,9mL de caldo BHI suplementado acrescido de diferentes concentrações de todas as substâncias testadas.

Para o óleo de copaíba testado contra *F.nucleatum* foram utilizadas as concentrações de 2 µL/mL; 0,2 µL/mL; 0,02 µL/mL e 0,002 µL/mL. O mesmo óleo foi utilizado nas concentrações de 0,2 µL/mL; 0,02 µL/mL; 0,002 µL/mL e 0,0002 µL/mL para o ensaio realizado com a bactéria *P. gingivalis*.

Na execução da CS do óleo de melaleuca contra *F.nucleatum* foram utilizadas as concentrações de 2 µL/mL; 0,2 µL/mL; 0,02 µL/mL e 0,002 µL/mL e contra *P.gingivalis* nas concentrações de 0,2 µL/mL; 0,02 µL/mL; 0,002 µL/mL e 0,0002 µL/mL.

As concentrações de digluconato de clorexidina utilizadas foram as mesmas para as duas bactérias: 2 µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,02 µg/mL; 0,002 µg/mL e 0,0002 µg/mL.

As DOs iniciais foram medidas em espectrofotômetro ajustado a 560 nanômetros logo após o preparo dos tubos com os inóculos, estabelecendo, deste modo, as DOs iniciais.

Após 16 horas de incubação a 37 °C em câmara de anaerobiose foram mensuradas as DOs finais de cada um das culturas, e estas comparadas com as DOs iniciais. As concentrações subinibitórias foram as maiores concentrações das substâncias testadas que possibilitaram o desenvolvimento bacteriano equivalente a

um aumento no valor na densidade óptica (Abs_{560nm}) igual ou mais próximo de 0,4 após 16 horas de incubação. O experimento foi realizado em triplicata.

4.7.2 Ensaio de Coagregação e Autoagregação

Alíquotas de 1 mL de cultura padronizada de *F.nucleatum* ou *P.gingivalis* (1×10^9 UFC/ml) foram inoculadas em 100 mL de caldo BHI suplementado acrescido das substâncias teste em suas diferentes concentrações subinibitórias. Foi utilizado o meio sem adição das substâncias como controle. Após 16 horas de incubação em atmosfera de anaerobiose a 37 °C foi determinada a capacidade de autoagregação e coagregação das células bacterianas.

Para este ensaio foram utilizadas microplacas de 96 poços de fundo redondo, pré-tratadas por PBS com Tween 20 (0,05%) por 30 minutos. Após a secagem da microplaca dentro de câmara de fluxo laminar, os inóculos das bactérias foram ajustados ($DO_{660} \sim 1,0$). Sucederam-se então a centrifugação a 10 °C, 6000 x g, por 2 minutos em centrífuga (5402, Eppendorf). O sobrenadante foi removido e as bactérias foram ressuspensas em tampão de coagregação (0.1mM $CaCl_2$, 0.1mM $MgCl_2$, 0.15M NaCl e 0.02% NaN_3 , dissolvidos em solução Tris 1.0mM e ajustados em pH 8.0). As células bacterianas foram lavadas mais duas vezes neste tampão. Para o ensaio de coagregação, cada poço recebeu 50 µL de suspensão padronizada de *F.nucleatum* e *P.gingivalis* desenvolvidas anteriormente na presença ou ausência de concentrações subinibitórias de cada uma das substâncias testadas. Para o ensaio de autoagregação, os poços receberam 50 µL de suspensão de cada bactéria e 50 µL de tampão de coagregação (Figura 4).

Figura 4 - Microplacas de 96 poços de fundo redondo, mostrando as combinações realizadas entre as bactérias tratadas para o ensaio de coagregação **(A)** e autoagregação **(B)**, os quais apresentam *P.gingivalis*, Pg; *F.nucleatum*, Fn; *P.gingivalis* que foram expostas ao óleo de melaleuca, Pg(M); *P.gingivalis* expostas ao óleo de copaíba, Pg(C); *P.gingivalis* tratadas com digluconato de clorexidina, Pg(X); *F.nucleatum* expostas ao óleo de melaleuca, Fn(M); *F.nucleatum* expostas ao óleo de copaíba, Fn(C), *F.nucleatum* expostas ao digluconato de clorexidina, Fn(X) e tampão de coagregação (T). Antes da introdução destes inóculos na microplaca, todos foram lavados duas vezes com tampão de agregação.

As microplacas foram mantidas sob agitação em plataforma agitadora (230400, Boekel Scientific), a 25 °C. Após cinco minutos, foi iniciada a leitura da DO_{655nm} de cada um dos poços em leitor de microplacas (680, Bio Rad). As leituras foram realizadas por 10 minutos com intervalos de 2 minutos, por mais 30 minutos a intervalos de 5 minutos, por 20 minutos a intervalos de 10 minutos totalizando 60 minutos de medições. A análise foi realizada a partir das diferenças de densidades ópticas entre os intervalos mensurados, comparadas ao controle negativo.

Para análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism (versão 5.04), para avaliação da significância estatística foi aplicada a Análise de Variância (ANOVA) e o teste de hipótese de Dunnet, que possibilitou a comparação do comportamento dos diferentes grupos de bactérias tratadas em relação ao tempo em que foram medidas as DOs e ao controle negativo (bactérias sem tratamento).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Identificação do óleo de *Melaleuca alternifolia* e de *Copaifera officinalis*

Após análise qualitativa por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, o óleo de copaíba apresentou como principais constituintes, respectivamente: trans-cariofileno, germacreno B, α -humuleno, germacreno D e α -copaeno. Outros analitos foram identificados, entretanto, concentrações menores. Cinco constituintes não foram identificados, contudo, o que se apresentava em maior concentração alcançava apenas 0,73% do óleo. Os dados integrais estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Analitos identificados no óleo de copaíba

t_R (min) ^(a)	IR ^(b)	Identificação	%rel. ^(c)
19,22	1335	δ -elemeno	0,53
19,72	1347	α -cubebeno	0,63
20,79	1373	α -copaeno	4,16
21,48	1389	β -elemeno	2,88
21,70	1395	cipereno	0,44
22,66	1419	trans-cariofileno	50,78
23,14	1431	γ -elemeno	0,89
23,25	1433	α -trans-bergamoteno	4,04
23,92	1450	α -humuleno	6,81
24,16	1456	seicheleno	0,47
24,87	1473	γ -muuroleno	1,34
25,02	1477	germacreno D	5,97
25,18	1481	β -selineno	0,75
25,60	1492	biciclogermacreno	0,95
25,79	1496	α -muuroleno	0,38
25,93	1500	α -bisaboleno	0,43
26,16	1506	β -bisaboleno	2,61
26,32	1510	γ -cadineno	0,69
26,71	1520	δ -cadineno	2,77
27,09	1530	M=204	0,43
27,95	1552	germacreno B	7,43
28,41	1565	álcool cariofileno	0,48
30,20	1612	M=222	0,60
31,32	1642	α -muurolol	0,57
31,61	1650	α -cadinol	0,66
33,07	1691	M=222	0,70
41,65	1945	M=262	0,73
44,86	-	M=272	0,41
52,09	-	ácido copálico	0,47

Nota: As siglas utilizadas significam:

(a) Tempo de arraste

(b) Índice de retenção

(c) Fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma

O óleo de melaleuca, após identificação de sua composição, apresentou os seguintes constituintes, respectivamente, em maiores concentrações: terpin-4-ol, γ -terpineno, α -terpineno, terpinoleno e 1,8-cineol. Outros analitos foram identificados, porém em menores concentrações. Todos os constituintes identificados no óleo estão dispostos na tabela 3.

Tabela 3 - Analitos identificados no óleo de melaleuca

t_R (min) ^(a)	IR ^(b)	Identificação	%rel. ^(c)
4,64	926	α -tujeno	1,01
4,81	933	α -pineno	2,41
5,75	973	sabineno	0,42
5,84	977	β -pineno	0,66
6,19	991	β -mirceno	0,73
6,59	1006	α -felandreno	0,47
6,98	1017	α -terpineno	11,17
7,20	1024	para-cimeno	2,07
7,34	1028	limoneno	1,55
7,40	1030	1,8-cineol	3,31
8,36	1059	γ -terpineno	21,22
9,33	1088	terpinoleno	3,55
10,53	1121	cis-para-ment-2-en-1-ol	0,29
12,89	1181	terpin-4-ol	40,17
13,30	1191	α -terpineol	2,97
22,13	1405	α -gurjuneno	0,49
22,51	1415	trans-cariofileno	0,53
23,30	1434	aromadendreno	1,37
24,16	1456	allo-aromadendreno	0,63
24,71	1469	Cis-muurola-4(14),5-dieno	0,45
25,57	1491	α -selineno	1,97
26,70	1520	δ -cadineno	2,09
28,95	1579	globulol	0,47

Nota: As siglas utilizadas significam:

(a) Tempo de arraste

(b) Índice de retenção

(c) Fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma

5.2. Análise da concentração inibitória mínima das soluções testadas

5.2.1 Padronização do inóculo de *P. gingivalis* e *F. nucleatum*

Foram determinados os valores de UFC/mL de cada uma das amostras, após desenvolvimento por 16 horas em meio BHI suplementado, correspondente à fase de crescimento exponencial. Os dados de média e desvio padrão de UFC/ml das culturas padronizadas a $Abs_{560nm} \sim 0,7$ estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Valores médios de UFC/ml de cultura de *P. gingivalis* e *F. nucleatum* em $Abs_{560nm} \sim 0,7$

Bactérias	Média	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
<i>P. gingivalis</i>	$2,34 \times 10^9$	2	0,85
<i>F. nucleatum</i>	$1,1 \times 10^9$	4	3,6

5.2.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A partir de inóculos padronizados de cada amostra bacteriana, foram obtidos os resultados de CIM para cada um dos agentes testados e para o agente controle (digluconato de clorexidina). Houve crescimento bacteriano em todos os meios de cultura sem adição das soluções teste. Além disso, a adição de Tween 80 na maior concentração empregada ($5\mu\text{L/mL}$), como veículo das soluções teste, não resultou em qualquer inibição do crescimento bacteriano.

A CIM do óleo de copaíba e a de melaleuca mostrou diferentes resultados para as bactérias testadas, sendo que *Fusobacterium nucleatum* foi mais resistente aos dois óleos testados, quando comparada a *Porphyromonas gingivalis*.

A solução do óleo de copaíba apresentou ação antimicrobiana contra *Porphyromonas gingivalis* a partir de $2\mu\text{L/mL}$, enquanto a CIM deste mesmo óleo contra *Fusobacterium nucleatum* foi de $100\mu\text{L/mL}$.

O óleo de melaleuca apresentou CIM de $2\mu\text{L/mL}$ contra *Porphyromonas gingivalis* e de $20\mu\text{L/mL}$ contra *Fusobacterium nucleatum*.

Por outro lado, as amostras bacterianas testadas foram igualmente sensíveis ao digluconato clorexidina, sendo a CIM determinada em 20 µg/mL. As fotografias do resultado deste experimento podem ser observadas na figura 5.

Figura 5 – Placas de ágar Brucella acrescido de sangue e suplementado como hemina e vitamina K, contendo os agentes testados, inoculadas com inóculos padronizados de *F. nucleatum* e *P. gingivalis*. Em (A) placa controle negativo, mostrando crescimento de *F. nucleatum* (fileira central) e *P. gingivalis* (fileira direita) Em (B) placa com óleo de copaíba a 20µL/mL mostrando apenas crescimento de *F. nucleatum*. Em (C), placa com digluconato de clorexidina a 2µg/mL mostrando crescimento bacteriano. Em (D), placa com óleo de copaíba 100µL/mL e em (E), placa contendo óleo de melaleuca 20µL/mL, ambas não mostraram crescimento de nenhuma das bactérias testadas.

5.3 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CBM foi determinada utilizando-se concentrações dos agentes maiores ou iguais às CIMs. Os controles negativos contendo Tween 80 e os que continham apenas o meio de cultura não resultaram em morte das bactérias testadas.

A solução à base de óleo de copaíba foi bactericida em todas as concentrações testadas contra *F. nucleatum*, tendo como CBM o valor de 100µL/mL (CBM=CIM), indicado pela ausência de crescimento da bactéria em ágar Brucella suplementado. Para *P. gingivalis* o óleo de copaíba foi bacteriostático nas concentrações testadas.

A solução contendo o óleo de melaleuca foi bactericida para *F.nucleatum* e *P.gingivalis* a partir de 20 µL/mL. Portanto, para *F.nucleatum*, o óleo de melaleuca apresentou o valor da CBM semelhante ao encontrado na CIM.

O digluconato de clorexidina foi bactericida para *F.nucleatum* a partir de 20 µg/mL (CIM=CBM) e para *P.gingivalis* na concentração de 200 µg/mL.

5.4 Determinação das concentrações subinibitórias

Foi determinada a concentração de cada um dos agentes testados que permitia o crescimento bacteriano similar ao controle, atingindo uma $Abs_{560nm} \sim 0,4$, após 16 horas de incubação sob condições padronizadas. Ambas as bactérias se desenvolveram adequadamente em caldo BHI suplementado sem a adição das soluções testadas (controle negativo), sendo que a cultura de *F. nucleatum* atingiu a $Abs_{560nm} \sim 0,48 \pm 0,03$ e de *P. gingivalis* $Abs_{560nm} \sim 0,43 \pm 0,09$.

O óleo de copaíba em concentração de 0,02µL/mL para *F.nucleatum* e de 0,002µL/mL para *P.gingivalis*, permitiu o crescimento bacteriano.

Foi observado crescimento bacteriano com a adição de óleo de melaleuca para *F.nucleatum* na concentração de 0,02µL/mL e para *P.gingivalis* na concentração de 0,002µL/mL.

A adição de digluconato de clorexidina nas culturas de *P.gingivalis* e *F.nucleatum* na concentração de 0,2µg/mL permitiu crescimento bacteriano similar ao controle negativo.

5.5 Correlação entre as soluções testadas e o controle negativo em ensaio de autoagregação

O ensaio de autoagregação foi realizado com a finalidade de determinar o efeito de doses subinibitórias de digluconato de clorexidina, óleo de melaleuca e óleo de copaíba na capacidade de autoagregação. Esse ensaio foi realizado com as amostras de *F. nucleatum* (ATCC 25586) e de *P. gingivalis* (ATCC 33277), contudo, essa última não foi capaz de se autoagregar nas condições empregadas.

Os dados foram analisados em espectrofotômetro ajustado a 655nm, em que era mensurada a densidade óptica do agregado de células formado no fundo do poço.

Quando as células de *F.nucleatum* foram tratadas com óleo de copaíba houve redução no processo de autoagregação, em quase todos os intervalos analisados, quando comparadas a *F.nucleatum* sem tratamento (Tabela 5).

O tratamento de *F.nucleatum* com óleo de melaleuca mostrou-se também bastante eficaz na inibição de autoagregação quando comparado às bactérias sem tratamento (Tabela 5).

As células de *F.nucleatum* tratadas com digluconato de clorexidina também apresentaram inibição de autoagregação, em quase todos os intervalos analisados, quando comparadas às bactérias do controle negativo (Tabela 5).

Tabela 5 - Diferença de DO_{655nm} em diferentes intervalos de tempo em ensaio de autoagregação de *F.nucleatum* expostas ao pré-tratamento com concentração subinibitória de digluconato de clorexidina (X), óleo de melaleuca (M) e óleo de copaíba (C) e no controle não tratado (Fn)

Intervalos (min)	Fn	Fn (C)	Fn (M)	Fn (X)
2 a 4	0,011	0,001 **	0,003 **	0,001 **
4 a 6	0,000	-0,004	0,001	0,002
6 a 8	0,008	-0,001 ***	0,001 **	0,004 *
8 a 10	0,009	0,000 ***	0,001 ***	0,003 ***
10 a 15	0,014	-0,001 **	-0,003 **	0,001 **
15 a 20	0,011	0,000 **	-0,001 ***	0,003 **
20 a 25	0,009	-0,001 **	-0,001 **	0,001 **
25 a 30	0,007	0,000 **	0,000 **	0,001 **
30 a 35	0,008	0,000 ***	-0,001 ***	0,001 **
35 a 40	0,008	-0,001 ***	0,000 **	0,001 **
40 a 50	0,006	0,000 **	-0,002 ***	-0,002 **
50 a 60	0,007	-0,002 **	-0,003 ***	0,000 **

Notas: Siglas e sinais utilizados:

Fn(C)	<i>F.nucleatum</i> tratado com óleo de copaíba
Fn(M)	<i>F.nucleatum</i> tratado com óleo de melaleuca
Fn(X)	<i>F.nucleatum</i> tratado com digluconato de clorexidina
Fn	<i>F.nucleatum</i> sem tratamento
*	Significante ($p < 0,5$) estatisticamente em relação ao <i>F.nucleatum</i> sem tratamento
**	Muito significativo ($p < 0,01$) estatisticamente em relação ao <i>F.nucleatum</i> sem tratamento
***	Extremamente significativo ($p < 0,001$) estatisticamente em relação ao <i>F.nucleatum</i> sem tratamento

5.6 Correlação entre as soluções testadas e o controle negativo em ensaio de coagregação

As células de *P. gingivalis* e *F. nucleatum* que se desenvolveram na presença de doses subinibitórias dos agentes testados foram submetidas a ensaios de coagregação. Os ensaios foram realizados tratando-se apenas *F. nucleatum*, apenas *P. gingivalis* ou ambas as amostras com as concentrações subinibitórias de digluconato de clorexidina, óleo de melaleuca, óleo de copaíba e estes comparados aos dados obtidos ao grupo sem tratamento (controle).

Os dados de coagregação foram também representados pela mensuração da DO das células bacterianas agregadas precipitadas no fundo do poço. Como apresentado na figura 5, visualmente, foi possível notar, em alguns poços, a formação de agregado bacteriano, indicando o processo de coagregação (Figura 6).

Figura 6 - Microplaca contendo bactérias em processo de coagregação

Os dados relativos à coagregação de *F. nucleatum* tratados com as diferentes substâncias e *P. gingivalis* sem tratamento estão apresentados na tabela 6. Pode ser observado que apenas o tratamento de *F.nucleatum* com o óleo de copaíba foi capaz de inibir a coagregação com *P. gingivalis* (Tabela 6).

Tabela 6 - Diferença de DO_{655nm} em diferentes intervalos de tempo em ensaio de coagregação entre *F.nucleatum* expostas ao pré-tratamento com *P.gingivalis* sem tratamento

Intervalo (min)	Fn Pg	Fn(C) Pg	Fn(M) Pg	Fn(X) Pg
2 a 4	0,005	0,000	0,009	0,002
4 a 6	0,003	-0,001 *	0,004	0,002
6 a 8	0,005	0,000 *	0,005	0,004
8 a 10	0,004	0,000 *	0,006	0,004
10 a 15	0,003	-0,002 **	0,006	0,001
15 a 20	0,002	-0,004 *	0,003	0,002
20 a 25	0,005	-0,006 **	0,008	0,003
25 a 30	0,000	-0,004	0,001	0,002
30 a 35	0,001	-0,004 *	0,001	0,001
35 a 40	-0,001	-0,005	0,002	0,002
40 a 50	-0,002	-0,007	-0,002	0,000
50 a 60	-0,002	-0,005	-0,001	0,000

Notas: Siglas e sinais utilizados:

Fn(C) Pg	<i>F.nucleatum</i> tratado com óleo de copaíba associada à bactéria <i>P.gingivalis</i> sem tratamento
Fn(M) Pg	<i>F.nucleatum</i> tratado com óleo de melaleuca associada à bactéria <i>P.gingivalis</i> sem tratamento
Fn(X) Pg	<i>F.nucleatum</i> tratado com digluconato de clorexidina associada à bactéria <i>P.gingivalis</i> sem tratamento
Fn Pg	<i>F.nucleatum</i> e <i>P.gingivalis</i> sem tratamento
*	Significante ($p < 0,5$) estatisticamente em relação às bactérias sem tratamento
**	Muito significativo ($p < 0,01$) estatisticamente em relação às bactérias sem tratamento

Quando o tratamento com uma das três substâncias foi realizado em *P.gingivalis* e estas submetidas ao ensaio de coagregação com *F.nucleatum* sem tratamento, foi observada uma leve alteração na capacidade de coagregação com as três soluções em apenas alguns intervalos de tempo (Tabela 7). Deve ser salientado que o tratamento de *P. gingivalis* com óleo de melaleuca, e em menor grau com clorexidina, resultou em maiores valores de DO nos momentos iniciais (Tabela 7).

Tabela 7 - Diferença de DO_{655nm} em diferentes intervalos de tempo em ensaio de coagregação entre *P.gingivalis* expostos ao pré-tratamento e *F.nucleatum* sem tratamento

Intervalo (min)	Fn Pg	Fn Pg (C)	Fn Pg(M)	Fn Pg (X)
2 a 4	0,005	0,012	0,019 -	0,018 -
4 a 6	0,003	0,003	0,007 -	0,005
6 a 8	0,005	0,002	0,007	0,004
8 a 10	0,004	0,001 *	0,005	0,003
10 a 15	0,003	0,000	0,006	0,001
15 a 20	0,002	-0,003 *	0,004	0,001
20 a 25	0,005	-0,004 *	0,007	0,004
25 a 30	0,000	-0,005 *	0,001	-0,001
30 a 35	0,001	-0,004 *	0,001	-0,002
35 a 40	-0,001	-0,005	0,001	-0,001
40 a 50	-0,002	-0,006 *	-0,001	-0,003
50 a 60	-0,002	-0,002	0,001	-0,002

Notas: Siglas e sinais utilizados:

- Fn Pg(C) *F.nucleatum* sem tratamento associada à bactéria *P.gingivalis* tratado com óleo de copaíba
- Fn Pg(M) *F.nucleatum* sem tratamento associada à bactéria *P.gingivalis* tratado com óleo de melaleuca
- Fn Pg(X) *F.nucleatum* sem tratamento associada à bactéria *P.gingivalis* tratado com digluconato de clorexidina
- Fn Pg *F.nucleatum* e *P.gingivalis* sem tratamento
- * Significante ($p < 0,5$) estatisticamente em relação às bactérias sem tratamento
- Bactérias apresentaram coagregação maior que o controle negativo ($p < 0,05$)

Quando ambas as amostras bacterianas, *F.nucleatum* e *P.gingivalis*, foram submetidas ao tratamento com uma das três substâncias, foi observado uma redução na capacidade de coagregação apenas com copaíba, de maneira análoga ao que ocorreu quando apenas uma das bactérias foi tratada com este agente

(Tabela 8). Por outro lado, o crescimento com óleo de melaleuca resultou em aumento da coagregação em relação ao controle em um dos intervalos de tempo analisados, como havia sido observado anteriormente com o tratamento apenas de *P. gingivalis*.

Tabela 8 – Resultado do processo de coagregação entre *P.gingivalis* e *F.nucleatum* expostas ao pré-tratamento

Intervalo (min)	Fn Pg	Fn(C) Pg(C)	Fn(M) Pg(M)	Fn(X) Pg (X)
2 a 4	0,005	0,002	0,004	0,006
4 a 6	0,003	0,000	0,005	0,003
6 a 8	0,005	0,002	0,003	0,003
8 a 10	0,004	0,001	0,003	0,003
10 a 15	0,003	0,000	0,004	0,000
15 a 20	0,002	0,001	0,003	0,002
20 a 25	0,005	-0,002 ***	0,008	0,005
25 a 30	0,000	-0,002	0,002	0,001
30 a 35	0,001	-0,003 ***	0,003 -	0,001
35 a 40	-0,001	-0,003	0,003	0,000
40 a 50	-0,002	-0,006	-0,001	-0,002
50 a 60	-0,002	-0,005	0,001	-0,002

Notas: Siglas e sinais utilizados:

Fn(C) Pg(C)	<i>F.nucleatum</i> tratado com óleo de copaíba associada à bactéria <i>P.gingivalis</i> tratado com o mesmo óleo
Fn(M) Pg(M)	<i>F.nucleatum</i> tratado com óleo de melaleuca associada à bactéria <i>P.gingivalis</i> tratado com o mesmo óleo
Fn(X) Pg(X)	<i>F.nucleatum</i> tratado com digluconato de clorexidina associada à bactéria <i>P.gingivalis</i> tratado com a mesma substância
Fn Pg	<i>F.nucleatum</i> e <i>P.gingivalis</i> sem tratamento
***	Extremamente significativa (p< 0,001) em relação às bactérias sem tratamento
-	Bactérias apresentaram coagregação maior que o controle negativo (p<0,05)

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 Escolha dos óleos e bactérias

Atualmente, a distribuição e a gravidade das doenças periodontais variam entre as diferentes partes do mundo e dentro do mesmo país ou região (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Em 2003, o Ministério da Saúde executou um levantamento epidemiológico de âmbito nacional na área de Saúde Bucal, que englobou 23 municípios, além das 26 capitais brasileiras e o Distrito Federal, com valor representativo das cinco macrorregiões do país. A percentagem de pessoas sem nenhum problema periodontal nas faixas etárias de 15 a 19, 35 a 44 e 65 a 74 anos de idade foi, respectivamente, 46,2%, 21,9% e 7,9%. Chama atenção o grande número de sextantes excluídos da pesquisa devida a ausência de dentes. Na faixa de 65 a 74, por exemplo, mais de 80% dos sextantes examinados foram excluídos, ou seja, não apresentavam nenhum dente presente ou apresentavam apenas um dente funcional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Em âmbito mundial, a doença periodontal é uma das duas doenças que mais afetam a população. Cerca de 10 a 15% da população mundial adulta contém bolsas periodontais profundas, com mais de 6 milímetros (PETERSEN et al., 2005).

F.nucleatum é uma das bactérias Gram-negativas que se estabelecem nos biofilmes e exercem um papel fundamental nas interações físicas entre as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, o que a torna importante para a colonização, além de contribuir para o estabelecimento de condições propícias para o surgimento de bactérias anaeróbias, intolerantes ao oxigênio. Considera-se *F.nucleatum* um colonizador intermediário entre as bactérias comensais e os patógenos (SIGNAT et al., 2011).

Entre as várias bactérias encontradas no biofilme subgengival, acredita-se que *P.gingivalis* seja o principal organismo associado com a doença periodontal crônica (PATHIRANA et al., 2010). Evidências sugerem que a redução dos níveis dessa bactéria em um sítio doente estava associada com a resolução da doença

neste local (VAN DYKE et al., 1988). Acredita-se ainda que esta bactéria possua a capacidade de invadir e se disseminar entre as células epiteliais, além de degradar os componentes da matriz celular e junções celulares (ANDRIAN et al., 2004; TRIBBLE et al., 2010).

O metronidazol foi introduzido no tratamento de infecções periodontais e causa a morte celular devido à interferência na síntese de ácidos nucleicos. Essa substância é eficaz contra bactérias anaeróbias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo *P. intermedia*, *P. gingivalis* e *Fusobacterium* sp (POULET et al., 1999). Portanto, a falta de especificidade do antimicrobiano acaba alterando a microbiota normal.

A clorexidina tem sido usada efetivamente por mais de 30 anos como antisséptico bucal (DUMITRESCU, 2010). Entretanto, apesar dos diversos efeitos colaterais que impossibilitam seu uso prolongado (AUTIO GOLD, 2008; DUMITRESCU, 2011; FDA, 1998; YONG et al., 1995), um fato raramente considerado é a possibilidade de interações entre os componentes dos enxaguatórios à base de clorexidina e os componentes dos dentifrícios, como o lauril sulfato de sódio e o monofluorofosfato de sódio, os quais podem reagir com o digluconato de clorexidina e assim participar da formação de sais de baixa solubilidade com diminuição da eficácia do enxaguatório (BARKVOLL et al., 1988; BARKVOLL et al., 1989).

A copaíba é uma planta comum a várias regiões do Brasil, sendo, muitas vezes, utilizada de maneira empírica, principalmente pela população indígena. Na cidade de Jordão, no Acre, muitas famílias utilizam esse óleo na região do coto umbilical de recém-nascidos. O óleo de copaíba, em nosso estudo mostrou não apenas um efeito antimicrobiano, como uma ação inibitória do processo de agregação bacteriana em concentrações que permitem o desenvolvimento bacteriano próximo ao normal, ditas concentrações subinibitórias.

O óleo de melaleuca vem tendo um enaltecimento de suas propriedades nas últimas décadas, como sua atividade anti-inflamatória e antimicrobiana de amplo espectro, portanto muitas pesquisas têm sido voltadas para sua ação antimicrobiana contra periodontopatógenos (HAMMER et al., 2003; KULIK et al., 2000; SHAPIRO et al., 1994; TAKARADA et al., 2004). Nota-se um interesse, no campo da pesquisa muito maior nesse óleo quando comparado ao óleo de copaíba, esse último muito

encontrado no Brasil. Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que apesar de apresentarem comportamentos diferentes frente aos experimentos realizados, ambos foram capazes de inibir o desenvolvimento microbiano e interferir na interação bacteriana, possivelmente interferindo na formação do biofilme dental.

6.2 Identificação do óleo de melaleuca

O óleo de melaleuca contém vários monoterpenos e sesquiterpenos, assim como componentes aromáticos. Aproximadamente 100 terpenos podem ser encontrados no óleo, mais de 60 destas substâncias já foram identificadas (SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER PRODUCTS, 2004).

Os monoterpenos terpinen-4-ol (40,17%), γ -terpineno (21,22%), α -terpineno (11,17%), 1,8-cineol (3,31%), para-cimeno (2,07%), α -terpineol (2,97%), α -pineno (2,41%), terpinoleno (3,55%), limoneno (1,55%) e sabineno (0,42%) são responsáveis por 88,84% da composição do óleo de melaleuca utilizado em nosso trabalho, este dado corrobora a determinação do Scientific Committee on Consumer Products (2004), a qual declara que estes monoterpenos devem ser responsáveis 80 a 90 % da composição do óleo.

Os principais analitos encontrados em nosso óleo (Tabela 2) seguem os padrões recomendados por World Health Organization (WHO) (2002) e International Organization for Standardization (ISO) (2004), os quais exigem respectivamente, α -pineno (1 a 5%; 1 a 6%), sabineno (até 3,5% pela ISO), α -terpineno (2,7 a 13%; 5 a 13%), p -cimeno (0,5 a 8%, 0,5 a 12%), limoneno (1 a 5%; 0,5 a 1,5%), 1,8-cineol (4.5 a 16.5%; até 15%), γ -terpineno (10 a 28% em ISO e WHO), terpinoleno (1 a 5%; 1,5 a 5%); terpin-4-ol (29 a 45%; 30 a 48%); α -terpineol (1,5 a 8% em ISO e WHO); aromadendreno (até 3% pela ISO); δ -cadineno (até 3% pela ISO) e globulol (até 1% pela ISO).

O componente α -tujeno não possui sua porcentagem bem estabelecida, contudo, nosso óleo apresentou a concentração de α -tujeno próxima à encontrada em outros estudos (BROPHY et al., 1989; CALCABRINI et al., 2004). As concentrações de β -pineno, β -mirceno e α -felandreno encontradas em nosso óleo também se mostram dentro dos padrões (COX et al., 2001).

Deste modo, o óleo de *Melaleuca alternifolia* usado neste estudo segue o recomendado como o padrão internacional para o óleo de melaleuca, tipo terpinen-4-ol (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2004).

6.3 Identificação do óleo de copaíba

Apesar de poderem apresentar alterações nas quantidades e tipos de diterpenos e sesquiterpenos, apenas essas classes de substâncias podem estar presentes na composição do óleo puro (Veiga Junior et al., 2002). O principal composto do óleo de copaíba é o trans-cariofileno (Cascon et al., 2000; Gomes et al., 2007). Os sesquiterpenos compreendem aproximadamente 80% dos óleos de copaíba, os principais são o α -copaeno, trans-cariofileno, β -bisaboleno, α e β -selineno, α -humuleno, δ -cadineno e γ -cadineno (Veiga-Júnior & Pinto 2002).

No óleo utilizado neste estudo, o trans-cariofileno também foi identificado como componente majoritário (Tabela 3). Dentre os sesquiterpenos citados, com exceção de α -selineno, γ -cadineno e β -selineno, todos se encontravam entre os principais componentes do óleo utilizado no presente estudo. Machado (2011) e Chen et al. (2009) também não identificaram estes analitos entre os principais constituintes de suas amostras de óleo extraído do tronco da árvore *Copaifera officinalis*.

Bivatti et al. (2006) e Veiga Junior et al. (1997), os quais estudaram a padronização cromatográfica do óleo de copaíba, observaram que em todas as suas amostras, independente da espécie, detectou-se o ácido copálico. Contudo, Estevão et al. (2009) e Gramosa et al. (2005), apesar de comprovarem a autenticidade de seus óleos, devido aos constituintes químicos identificados, não detectaram o ácido copálico em suas amostras. No óleo utilizado neste trabalho (Tabela 3), o ácido copálico também foi identificado, concordando com os resultados encontrados por Bivatti et al. (2006) e Veiga Junior et al. (1997).

O óleo utilizado no presente estudo continha ainda B e D-germacreno entre seus principais compostos, (Tabela 3). Machado (2001) identificou os mesmos compostos nas concentrações de 8% e 5,95%, dados muito semelhantes aos encontrados neste trabalho. Outro analito encontrado entre os principais

componentes de nosso óleo foi o α -trans-bergamoteno, também encontrado em altas concentrações em várias espécies de *Copaifera* analisadas (Araújo 2010; Cascon et al., 2000). Tais dados comprovam a autenticidade do óleo utilizado no presente estudo.

Há grande quantidade de estudos acerca dos óleos de copaíba, contudo poucas referências discriminam a espécie de *Copaifera* que está sendo estudada e somente cinco espécies têm sua composição química descrita na literatura (VEIGA JUNIOR et al, 2002).

Observamos, durante a análise dos analitos encontrados no óleo utilizado nesta pesquisa, falta de coesão nas informações acerca da composição dos óleos de copaíba, isso pode ocorrer, em partes, devido à grande variação do produto, a qual acredita-se estar relacionada à concentração e natureza dos diterpenos e sesquiterpenos presentes de acordo com variações de espécies, fatores biológicos como insetos e fungos e fatores abióticos como interferência climática (PIERI et al., 2009; VEIGA JUNIOR et al., 2002). Outro problema importante é a eventual mistura dos óleos de espécies botânicas variadas, ou ainda de espécimes de idades e locais distintos. Este fato é agravado pela dificuldade de se proceder à diferenciação morfológica entre as espécies (TAPPIN et al., 2004).

6.4 Concentração Inibitória Mínima

Protocolos de padronização de procedimentos clínicos e laboratoriais (CLSI, 2007) recomendam o método de diluição em ágar para determinação da CIM para uma ampla variedade de bactérias anaeróbicas, enquanto que o método de microdiluição em caldo é recomendado apenas para *Bacteroides fragilis*. O método de diluição em ágar tem sido extensivamente utilizado, sendo recomendado como o método de referência para todas as bactérias anaeróbicas (CLSI, 2007).

O teste de difusão em ágar, além de não ser recomendado para bactérias anaeróbicas, é inadequado para teste de CIM com óleos essenciais, como o de melaleuca, pois ocorre a separação dos componentes do óleo através do ágar de acordo com a afinidade de alguns de seus componentes com a água (SOUTHWELL et al. 1993).

Para solubilização dos óleos de copaíba e melaleuca, em altas concentrações, ao meio de cultura, de maneira que o mesmo permanecesse homogêneo até sua solidificação, utilizou-se Tween 80 a 5 µl/mL. Essa concentração não mostrou atividade antimicrobiana nos experimentos realizados. A concentração de 5µl/mL de Tween 80 também foi utilizada em diversos experimentos que testavam a atividade antimicrobiana de substâncias oleosas, não influenciando o crescimento das bactérias testadas (GUSTAFSON et al., 1998).

Com relação ao resultado das CIMs, o digluconato de clorexidina inibiu o crescimento de *P.gingivalis* e *F.nucleatum* a 20 µg/mL, portanto, o resultado obtido foi compatível aos encontrados em outros trabalhos (AMORIM et al., 2004; KULIK et al., 2000).

Apesar das duas bactérias serem susceptíveis ao óleo de copaíba, *F.nucleatum* foi mais resistente à solução com este óleo quando comparada a *P.gingivalis*. Contudo, não se sabe exatamente quais analitos participam ativamente da atividade antimicrobiana deste óleo e se há possibilidade de isolá-los, o que poderia amplificar o poder de ação antimicrobiana do óleo. Outra possibilidade é que os componentes do óleo atuem de maneira sinérgica, impedindo o isolamento de apenas alguns poucos analitos sem alteração da atividade antimicrobiana.

O óleo de copaíba ainda mostra-se pouco difundido no campo da pesquisa científica, contando com poucos trabalhos na área da microbiologia. O único trabalho com enfoque na microbiota bucal (PIERI, 2007) testou o óleo de *Copaifera officinalis* contra *Streptococcus mutans*, encontrando concentração inibitória a partir de 0,078 µL/mL.

Mendonça et al.(2009) testou o óleo de *Copaifera Multijuga* sobre as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* encontrando os valores de CIM de 15,6µL/mL; 31,2µL/mL e 125µL/mL respectivamente.

Nota-se uma escassez de trabalhos publicados com o óleo de copaíba, principalmente quando voltado às bactérias da cavidade bucal, o que impossibilita a comparação entre os dados. Os poucos trabalhos encontrados com o óleo de copaíba voltados à microbiologia geralmente não apresentam a identificação dos analitos do óleo, o que dificulta estabelecer parâmetros entre os trabalhos da

literatura. Observa-se ainda que os trabalhos com óleo de copaíba com ênfase na sua função antimicrobiana são recentes.

F.nucleatum também apresentou maior resistência ao óleo de melaleuca do que *P.gingivalis*. Contudo, dentre os constituintes do óleo de melaleuca, acredita-se que os principais componentes com atividade antibacteriana sejam terpinen-4-ol e α -terpineol, os quais podem contribuir substancialmente para a atividade antibacteriana do óleo, apresentando CIMs e CBMs iguais, ou ligeiramente inferiores aos valores obtidos para o óleo de melaleuca (LOUGHLIN et al., 2008; RAMAN et al., 1995). Portanto, o descobrimento de sinergismo entre os analitos deste óleo e a identificação de seus efeitos antimicrobianos viabilizaria o isolamento destes componentes, o que amplificaria sua ação antimicrobiana.

O resultado da CIM, no presente trabalho, para a bactéria *Fusobacterium nucleatum* tratada com óleo de melaleuca foi de 20 μ L/mL e para *Porphyromonas gingivalis* de 2 μ L/mL. Takarada et al., em 2004, realizaram experimentos para determinar a CIM destas mesmas bactérias expostas ao óleo de melaleuca, contudo a CIM encontrada para *F.nucleatum* foi de 0,6 μ L/mL e para *P.gingivalis* de 1,3 μ L/mL. Portanto, apesar das CIMs encontradas para *P.gingivalis* apresentarem valores equivalentes entre os dois trabalhos, uma vez que em nosso experimento foram utilizadas apenas diluições de 1/10, o valor de CIM encontrado para a bactéria *F.nucleatum* foi muito superior ao encontrado por Takarada et al.(2004).

Além disso, diferente dos nossos dados, Takarada et al. (2004) descreveram que a bactéria *F.nucleatum* foi mais susceptível ao óleo de melaleuca do que *P.gingivalis*. Essas discrepâncias nos dados podem ter ocorrido devido à metodologia empregada, uma vez que Takarada et al.(2004) utilizaram microdiluição em caldo, contrariando, deste modo, a metodologia preconizada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (2007), que recomenda a diluição em ágar para bactérias anaeróbicas.

Hammer et al., em 2003, realizaram estudos para determinação de CIM do óleo de melaleuca sobre mais de vinte gêneros diferentes de bactérias, dentre elas *Fusobacterium* sp. Em seus resultados, *Fusobacterium* spp estavam entre as bactérias mais resistentes ao óleo de melaleuca, apresentando CIM que variou de 2,5 μ L/mL à 20 μ L/mL. A bactéria *Porphyromonas endodontalis*, um importante patógeno das lesões periapicais, mostrou inibições em seu crescimento que

variavam de 0,25µL/mL à 1µL/mL. Os resultados encontrados por Hammer et al.(2003), apesar das bactérias utilizadas serem do mesmo gênero, mas não necessariamente da mesma espécie que em nosso experimento, foram muito semelhantes aos nossos resultados.

Shapiro et al.(1994), encontraram, como concentração inibitória mínima, para a bactéria *F.nucleatum* um resultado maior ou igual a 6µL/mL e para *P.gingivalis* 1,1µL/mL, os quais, apesar de realizados pela técnica de microdiluição em caldo, são semelhantes aos resultados encontrados em nosso trabalho. Os dados encontrados por Shapiro et al. (1994) corroboram os nossos, demonstrando uma maior resistência de *F.nucleatum* quando comparada a *P.gingivalis*.

Notou-se uma grande variação nos resultados de CIM relatados na literatura, isso pode ocorrer devido às diferentes metodologias empregadas, à quantidade do inóculo utilizado ou ainda à composição do óleo empregado no estudo. Apesar de muitas revistas científicas exigirem a identificação do óleo, muitos trabalhos não descrevem tal composição detalhadamente, dificultando a comparação entre os diferentes resultados encontrados. Deve-se notar, também, que os dados não estão expressos em g/ml, mas em microlitros, e a obtenção dos extratos não é padronizada, o que poderia justificar também diferenças nas CIM observadas.

Porém, nota-se que há necessidade de maiores estudos acerca dos analitos isolados dos óleos e suas efetividades antibacterianas, o que poderia possibilitar seu uso isolado resultando em uma possível amplificação do efeito dos componentes dos óleos de copaíba ou de melaleuca.

Os resultados de CIM encontrados para o óleo de copaíba não foram comparados aos resultados encontrados para o óleo de melaleuca devido à falta de informação acerca do princípio ativo efetivo destes óleos contra as bactérias testadas. A falta de informação sobre os princípios ativos desses óleos que foram efetivos na inibição do crescimento de *P gingivalis* e *F nucleatum* e suas quantidades em cada óleo, impossibilitam tal comparação.

6.5 Concentração Bactericida Mínima

A metodologia empregada na determinação da CBM dos óleos de copaíba e de melaleuca foi a diluição em caldo (GUSTAFSON et al., 1998), com algumas modificações, como a lavagem das bactérias em caldo BHI antes de seu plaqueamento em ágar Brucella suplementado, desse modo, removeu-se o agente antimicrobiano testado para que o seu resquício não interferisse no resultado.

Com relação ao resultado das CBMs, o digluconato de clorexidina foi bactericida para *F.nucleatum* a partir de 20µg/mL e para *P.gingivalis* na concentração de 200µg/mL. Portanto, a bactéria *F.nucleatum* mostrou-se mais sensível que *P.gingivalis* ao agente.

Kulik et al. (2000), encontrou CBM de 5µg/mL para *F.nucleatum* e 16µg/mL para *P.gingivalis*, tal resultado mostrou-se compatível com nossos achados para a bactéria *F.nucleatum*. A diferença na CBM para *P.gingivalis* entre os trabalhos pode estar relacionada à diferença na concentração dos inóculos utilizados, que em nosso trabalho foi utilizado em maior concentração.

Contudo, em ambos os trabalhos, *P.gingivalis* mostrou-se mais resistente ao digluconato de clorexidina. Grenier et al. (1995), observaram que tal resistência pode estar relacionada às vesículas liberadas por *P. gingivalis*, as quais podem se vincular ao digluconato de clorexidina, permitindo assim proteção para si e para outras espécies bacterianas bucais. Também foi demonstrado que os lipopolissacarídeos são os principais componentes envolvidos entre a ligação do digluconato de clorexidina e estas vesículas.

Apesar disso, os resultados corroboram o uso desta substância em solução aquosa a 0,12% como coadjuvante ao tratamento da doença periodontal, sendo que ambas as bactérias não mostraram crescimento nessas condições.

Em relação ao óleo de copaíba, os resultados encontrados no presente trabalho indicaram que o óleo apresentou comportamento bactericida para *F.nucleatum* a partir de 100µL/mL, enquanto que para *P.gingivalis* o óleo foi apenas bacteriostático. Nos resultados relatados por Pieri (2007), o óleo de *Copaifera officinalis* também mostrou um caráter bacteriostático frente à bactéria *Streptococcus mutans*.

Santos et al (2008) encontraram CBM do óleo de *Copaifera officinalis* para as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (resistente à meticilina), *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis* de 0,0625mg/mL; 0,25mg/mL; 0,0312mg/mL; 0,0312mg/mL e 0,0625mg/mL respectivamente.

O componente trans-cariofileno, o qual apresenta-se como analito majoritário do óleo de copaíba, demonstrou um eficiente efeito antimicrobiano, determinado pela concentração inibitória mínima, contra muitas bactérias, entre elas *P.gingivalis*, contudo sua maior eficácia foi verificada frente às bactérias Gram-positivas *Actinomyces naeslundii* e *Propionibacterium acnes* (KANG et al., 1992).

Portanto, no presente estudo, o óleo de copaíba apresentou efeito bacteriostático perante a bactéria Gram-negativa *P.gingivalis*, contudo acredita-se que essa bactéria necessite de outras, como *F.nucleatum*, para seu estabelecimento no biofilme (SOCRANSKY et al., 2002). Assim sendo, a eliminação destas bactérias essenciais para o estabelecimento do biofilme inviabilizaria o estabelecimentos de outras bactérias consideradas mais patogênicas, como *P.gingivalis*. Contudo mais estudos precisam ser realizados, principalmente envolvendo os seus analitos isolados e o sinergismo entre eles, com a finalidade de verificar se há analitos que apresentam efeito bactericida ou bacteriostático e se há possibilidade de viabilizar a utilização destes componentes isolados.

Em nosso experimento, o óleo de melaleuca foi bactericida a partir de 20 µL/mL para as duas bactérias. Takarada et al.(2004), relatou que o óleo de melaleuca foi bactericida para *F.nucleatum* e *P.gingivalis* a partir de 2,5µL/mL e 5µL/mL respectivamente. Tais dados estão de acordo com nossos resultados, dadas as proporções utilizadas nas diluições.

Hammer et al.(2003), avaliou o efeito bactericida do óleo de melaleuca frente às bactérias *Fusobacterium* spp., o qual relatou tal efeito em concentrações que variavam de 2,5 µL/mL a 20 µL/mL, corroborando nossos achados.

Esses achados podem estar correlacionados com os resultados encontrados por Cox et al. (2000), que em relação às bactérias Gram-negativas, demonstraram que o óleo de melaleuca inibiu a respiração, alterou a permeabilidade da membrana e provocou extravasamento de potássio imediatamente após o contato de

Escherichia coli com as concentrações inibitórias e bactericidas mínimas do óleo de melaleuca.

Gustafson et al. (1998) relataram autólise, perda de constituintes celulares e coagulação do citoplasma das células de *Escherichia coli* cultivadas na presença tratada do óleo de melaleuca. Porém, os resultados encontrados por Carson et al. (2002), demonstraram que embora a membrana citoplasmática da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* seja comprometida pelo tratamento com o óleo de melaleuca, o principal mecanismo de ação deste óleo e de seus componentes não estava relacionado ao dano à célula culminando na lise celular

Embora tenha sido indicada que a perda de material intracelular, incapacidade de manter a homeostase e inibição da respiração após o tratamento com óleo de melaleuca e / ou componentes são consistentes com um mecanismo de ação envolvendo a perda da integridade da membrana e da função, os mecanismos antibacterianos do óleo de melaleuca ainda precisam ser mais bem elucidados.

De modos gerais, os óleos fitoterápicos contém um grande número de componentes e seu modo de ação envolve vários alvos na célula bacteriana. A maioria dos autores considera a característica lipofílica de seus constituintes como a propriedade que explicaria a atividade antimicrobiana, característica que permitiria a partição destes compostos nos lipídeos da membrana celular e da mitocôndria, aumentando sua permeabilidade e levando ao extravasamento do conteúdo celular. Baseado nesta hipótese, acredita-se que os terpenos, encontrados em abundância no óleo de copaíba e de melaleuca, estejam envolvidos no processo de ruptura da membrana bacteriana devido sua característica lipofílica (COWAN, 1999).

Entretanto, este parece não ser o único mecanismo envolvido na atividade antimicrobiana dos óleos fitoterápicos, uma vez que o germacreno D, o qual pode ser encontrado no óleo de copaíba, por ser um hidrocarboneto, apresenta características lipofílicas acentuadas e não inibiu o crescimento microbiano até a concentração de 5000 µg/mL (DEUSCHLE et al., 2007).

O óleo de copaíba parece possuir efeitos colaterais amenos, podendo ser utilizado, no caso de comprovada sua ação antimicrobiana e baixa citotoxicidade, como um óleo ou apenas como alguns analitos isolados, de maneira prolongada ou adicionados na composição de dentifrícios, materiais odontológicos e enxaguatórios

bucais. Contudo, para isso, mais pesquisas devem ser realizadas, principalmente sobre sua toxicidade, a fim de viabilizar sua possível utilização.

O óleo de melaleuca apresentou eficácia frente às bactérias *P.gingivalis* e *F.nucleatum* e acredita-se que possua baixa toxicidade quando utilizado de maneira tópica, porém sua ingestão é contraindicada e alguns indivíduos podem apresentar reações alérgicas quando expostos aos produtos de oxidação do óleo, que são formados devido à exposição à luz ou ao ar. Portanto, mais estudos precisam ser realizados para ampliar o conhecimento sobre sua eficácia e sobre sua toxicidade.

O óleo de melaleuca apresenta sua composição, apesar de variável, bastante padronizada. Contudo, o óleo de copaíba não possui tal característica de padronização de sua composição, variando muito em sua composição, até em relação às árvores da mesma espécie. Portanto, apesar de não haver estudos para comparação de CIM e CBM do óleo de copaíba utilizando as bactérias *F.nucleatum* e *P.gingivalis*, supõem-se que os resultados encontrados futuramente poderão variar bastante. Para aumentar a relevância dos dados e aumentar sua fidedignidade, o óleo de copaíba deveria, assim como o de melaleuca, sofrer padronizações e descrições mais rígidas de seus componentes e de suas concentrações, relacionadas à espécie da árvore estudada.

Vale ressaltar que o óleo de melaleuca, apesar de apresentar efeito antimicrobiano contra *F.nucleatum* e *P.gingivalis* em nosso trabalho, é um óleo nativo da Austrália e não é encontrado no Brasil, o que aumenta muito seu custo financeiro, dificultando sua possível utilização terapêutica, em larga escala, pela população brasileira.

6.6 Efeito de Concentração Subinibitórias (CS) de óleo de melaleuca e copaíba na coagregação e autoagregação

6.6.1 Concentração Subinibitória (CS)

A determinação da CS do digluconato de clorexidina e dos óleos de copaíba e de melaleuca, proposta por Cai (1994) e utilizada em nosso trabalho, foi realizada a

partir da diluição em caldo de concentrações menores que as encontradas na CIM, a qual permite um dado mais preciso quando comparada a determinação de CS através do cálculo de metade do valor encontrada como CIM. Contudo, apesar de não tão muito precisa, esta última metodologia mostra-se bastante difundida.

Okamoto et al. (2002), relatou como concentração subinibitória para o digluconato de clorexidina, através do cálculo de metade do valor encontrado em sua CIM, 4 µg/mL para *F.nucleatum* (ATCC 25586). Este valor se mostra acima do encontrado em nosso trabalho, pois em nosso trabalho, procurou-se estabelecer um valor de CS que permitisse o desenvolvimento bacteriano próximo ao encontrado no controle negativo.

Millward et al.(1990) relataram a quantidade de 0,75 µg/mL como valor encontrado para CS do digluconato de clorexidina, o qual permitiu o aumento do número de células viáveis. Este resultado mostra-se pertinente aos nossos achados, porém optamos por um valor um pouco abaixo devido à necessidade de alta concentração de bactérias para realização do ensaio de coagregação e autoagregação com as bactérias expostas às concentrações subinibitórias das substâncias testadas, similar ao observado na ausência do agente antimicrobiano.

Em relação às concentrações subinibitórias do óleo de copaíba e do óleo de melaleuca, não foram encontrados trabalhos que estabelecessem estas concentrações e descrevessem a metodologia utilizada.

6.6.7 Ensaio de coagregação e autoagregação

Durante o ensaio de coagregação, o óleo de copaíba foi bastante eficaz na inibição deste processo em células de *Fusobacterium nucleatum* tratadas com este óleo, uma vez que apresentou resultado satisfatório quando comparado ao controle negativo. Esta inibição no processo de coagregação foi menos acentuada quando *P.gingivalis* e *F.nucleatum* foram tratadas com concentrações subinibitórias deste óleo e ainda mais discreto quando apenas a bactéria *P.gingivalis* foi submetida à exposição ao óleo de copaíba. No processo de autoagregação de *F.nucleatum*, a adição do óleo de copaíba resultou em diferença estatística quando comparado controle negativo.

Santos et al. (2008) avaliaram, através microscopia eletrônica de transmissão e varredura, células de *Staphylococcus aureus* tratadas com concentrações subinibitórias de *Copaifera martii* e observaram danos na parede celular, liberação de compostos citoplasmáticos, alteração na morfologia, diminuição do volume celular e lise da célula. No presente estudo, não houve lise, pois as bactérias continuaram se desenvolvendo na mesma velocidade que na ausência do óleo, na concentração empregada, mas possivelmente, o óleo de copaíba exerceu efeito superfície celular bacteriana, o que poderia influenciar no processo de coagregação e de autoagregação.

O óleo de melaleuca, assim como o digluconato de clorexidina, inibiu apenas o processo de autoagregação de *F. nucleatum* e não mostrou efetividade em relação à coagregação com *P. gingivalis*, pelo contrário, em alguns intervalos notou-se um aumento nas densidades ópticas de bactérias tratadas com estas soluções.

Em relação a este aumento nos valores das densidades ópticas relacionadas ao processo de coagregação de bactérias tratadas com óleo de melaleuca e com digluconato de clorexidina, pode-se conjecturar que tal fato devido ao resultado de divisões incompletas das células bacterianas, originando células mais pesadas que sedimentariam mais rapidamente no fundo dos poços.

Lee (2001) notou que as bactérias *P.gingivalis* 381 tratadas com concentrações subinibitórias de digluconato de clorexidina, apresentavam menos coagregação com *Streptococcus oralis*, contudo, esta inibição era dependente da concentração utilizada. Em nosso trabalho, utilizamos concentrações subinibitórias que permitissem o desenvolvimento da bactéria próximo do normal, talvez, este fato tenha possibilitado a coagregação entre as bactérias tratadas com o digluconato de clorexidina.

Assim, os dados do presente estudo sugerem que o óleo de copaíba e óleo de melaleuca tem potencial para serem usados como agentes antimicrobianos no controle da microbiota associada às doenças periodontais, por sua capacidade bactericida e bacteriostática, bem como por interferir na interação entre as bactérias quando em baixas concentrações, possivelmente interferindo nos processos de formação de biofilme.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Baseados nos resultados obtidos a partir das metodologias empregadas, verificamos que:

- ✓ O óleo de melaleuca foi eficaz na inibição de crescimento de *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, sendo que esta última bactéria foi mais resistente ao óleo sugerindo, desta forma, que a bactéria mais agressiva ao periodonto, *Porphyromonas gingivalis*, seja mais sensível ao óleo;
- ✓ O óleo de melaleuca mostrou-se bactericida para *P.gingivalis* e *F.nucleatum*, sendo que para essa última o valor obtido como CIM foi também bactericida;
- ✓ O óleo de copaíba foi eficaz na inibição de crescimento das duas bactérias, sendo que *F.nucleatum* mostrou-se mais resistente ao óleo;
- ✓ O óleo de copaíba, apesar de bactericida para *F.nucleatum*, não apresentou o mesmo comportamento para *P.gingivalis* até as concentrações testadas;
- ✓ O óleo de copaíba inibiu a coagregação entre *P.gingivalis* e *F.nucleatum*, assim como a autoagregação desta última bactéria;
- ✓ O óleo de melaleuca inibiu o processo de autoagregação de *F.nucleatum*, contudo, foi ineficaz da redução de coagregação entre *P.gingivalis* e *F.nucleatum*;

Assim, podemos concluir que o óleo de copaíba e óleo de melaleuca têm potencial para serem usados como agentes antimicrobianos no controle da microbiota associada às doenças periodontais, por sua capacidade bactericida e bacteriostática, bem como por interferir nos processos de formação de biofilme.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Abul RA, Mitchell RN. Fundamentos de Robbins & Cotran: patologia. 7th ed; 2006.

Alencar JC. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne - Leguminosaseae, na Amazônia Central: germinação. Acta Amazônica. 1981;12(1):75-89.

Alexandre RF, Bagatini F, Simões CMO. Interações entre fármacos e medicamentos fitoterápicos à base de ginkgo ou ginseng. Rev Bras Farmacogn. 2008;18(1):117-26.

Almeida DS. Entre lojas e boticas: o comércio de remédio entre o Rio de Janeiro e Minas Gerais (1750-1808) [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade de São Paulo; 2008.

Altman PM. Australian tea tree oil. Aust J Pharm 1988;69:276-8.

Amorim CV, Aun CE, Mayer MP. Susceptibility of some oral microorganisms to chlorhexidine and paramonochlorophenol. Braz Oral Res. 2004;18(3):242-6.

Andrian E, Grenier D, Rouabhia M. *In vitro* models of tissue penetration and destruction by Porphyromonas gingivalis. Infect Immun. 2004;72(8):4689-98.

Araujo RC. Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores da fermentação ruminal in vitro [tese]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo; 2010.

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

Banes-Marshall L, Cawley P, Phillips CA. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against bacterial and Candida spp. isolates from clinical specimens. Br J Biomed Sci. 2001;58(3):139-45.

Barceloux DG. Medical toxicology of natural substances: foods, fungi, medicinal herbs, plants and venomous animals. John Wiley & Sons: Hoboken; 2008

Barkvoll P, Rølla G, Bellagamba S. Interaction between chlorhexidine digluconate and sodium monofluorophosphate in vitro. Scand J Dent Res. 1988;96(1):30-3.

Barkvoll P, Rølla G, Svendsen K. Interaction between chlorhexidine digluconate and sodium lauryl sulfate in vivo. J Clin Periodontol. 1989;16(9):593-5.

Bassett IB, Pannowitz DL, Barnetson RS. A comparative study of tea-tree oil versus benzoylperoxide in the treatment of acne. Med J Aust. 1990;153(8):455-8.

Biavattil MW, Dossin D, DeschampsII FC, Lima MP. Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. Rev Bras Farmacogn. 2006;16(2):230-5

Bjelland S, Bray P, Gupta N, Hirscht R. Dentists, diabetes and periodontitis. Aust Dent J. 2002;47(3):202-7.

Boles MM, Lyra MC, Flório FA, Orgaes S, Marques BPA, Gonella HA. Curativo imediato com hidrogel à base de água, óleo de *Melaleuca alternifolia* e emulsificantes após queimaduras. Rev Bras Cir Plást. 2008; 23(4):328-31.

Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. Clin Microbiol Rev. 1996;9(1): 55-71.

Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C. Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. Infect Immun. 1998;66(10):4729-32.

Breed RS, Murray EGD, Smith NR. Bergey's manual of determinative bacteriology. 7th ed. Baltimore:Williams & Wilkins, Baltimore; 1957.

Brophy JJ, Davies NW, Southwell IA, Stiff IA, Lyall RW. Gas Chromatographic Quality Control for Oil of Melaleuc Terpinen-4-01 Type (Australian Tea Tree). J Agric Food Chem. 1989;37(5):1330-5.

Buchanan RE, Gibbons NE. Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. Baltimore: Williams & Wilkins Company; 1974.

Cai S. Influência de concentrações subinibitórias de agentes químicos na aderência à hidroxiapatita revestida por saliva e na hidrofobicidade e autoagregação de *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus mutans* [tese]. São Paulo (SP): Instituto de Ciencias Biomédicas; Universidade de São Paulo; 1994.

Calcabrini A, Stringaro A, Toccaceli L, Meschini S, Marra M, Colone M, Salvatore G, Mondello F, Arancia G, Molinari A. Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits the in vitro growth of human melanoma cells. J Invest Dermatol. 2004;122(2):349-60.

Carranza FA Junior. Periodontia clínica de Glicckman. 5th ed. Rio de Janeiro:Interamericana; 1983.

Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. Clin Microbiol Rev. 2006;19(1):50-62.

Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(6):1914-20.

Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. Lett Appl Microbiol. 1993;16(2):49-55.

Cascon V. Copaíba: *Copaifera* spp. In: Carvalho JCT. Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. 1st ed. Ribeirão Preto: Tecmedd; 2004.

Cascon V, Gilbert B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry*. 2000;55(7):773-8.

Castro C, Silva ML, Pinheiro AL, Jacovine LAG. Análise econômica do cultivo e extração do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. *Revista Árvore*, 2005;29(2):241-9.

Chen F, Al-Ahmad H, Joyce B, Zhao N, Köllner TG, Degenhardt J, Stewart CN Jr. Within-plant distribution and emission of sesquiterpenes from *Copaifera officinalis*. *Plant Physiol Biochem*. 200;47(11-12):1017-23.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: approved standard. 7th ed. Wayne:CLSI; 2007.

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

Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol*. 2000;88(1):170-5.

Cox SD, Mann CM, Markham JL. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol*. 2001;91(3):492-7.

De Moura KCG, Emery FS, Neves-Pinto C, Pinto MCFR, Danta AP, Salomão K, et al. trypanocidal activity of naftoquinonas from *Tabebuia* and some heterocyclic derivatives: a review from an interdisciplinary study. *Journal Brazil Chemistry Soc*. 2002;12(3): 325-38.

Deuschle RAN, Camargo T, Alves SH, Mallmann CA, Heizmann BM. Fracionamento do extrato diclorometânico de *Senecio desiderabilis* Vellozo e avaliação da atividade antimicrobiana. *Rev Bras Farmacogn*. 2007;17(2):220-23.

Dumitrescu AL. Antibiotics and atiseptics in periodontal therapy. 1st ed. Berlin: Springer; 2011.

Dwyer JD. The Central American, West Indian and South American species of *Copaifera* (Caesalpiniaceae). *Brittonia*. 1951;7(3):143-72.

Edler FC. *Boticas & farmacias: uma história ilustrada da farmácia no Brasil*. 1st ed. Rio de Janeiro: Casa da Palavra; 2006.

Estevão LRM, Medeiros JP, Scognamillo-Szabó MVR, Baratella-Evêncio L, Guimarães EC, Câmara CAG, Evêncio-Neto J. Neoangiogênese de retalhos cutâneos em ratos tratados com óleo de copaíba. *Pesq Agropec Bras*. 2009;44(4):406-12.

Farag RS, Shalaby AS, El-Baroty GA, Ibrahim NA, Ali MA, Hassan EM. chemical and biological evaluation of the essential oils of different *Melaleuca* Species *Phytother Res*. 2004;18(1):30-5.

FDA- Food and Drug Administration [homepage na internet]. Maryland: Food and Drug Administration; 1998 [acesso em 2011 jan 6]. Disponível em: <http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/AlertsandNotices/PublicHealthNotifications/ucm062306.htm>.

FDA- Food and Drug Administration [homepage na internet]. Maryland: Food and Drug Administration; 2010 [acesso em 2011 jan 15]. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?FR=172.510>.

Garozzo A, Timpanaro R, Stivala A, Bisignano G, Castro A. Activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on Influenza virus A/PR/8: Study on the mechanism of action. *Antiviral Res*. 2011;89(1):83-8.

Garrido, ADB. Estudo comparativo da biocompatibilidade e propriedades físico-químicas de um novo cimento endodôntico [tese]. Amazonas: Universidade Federal do Amazonas; 2004.

Gibbons RJ, Nygaard M. Interbacterial aggregation of plaque bacteria. *Arch Oral Biol*. 1970;15(12):1397-400.

Gibson FC, Genco CA. The Genus *Porphyromonas*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. The prokaryotes. 3rd ed. vol 7. Springer Science+Business Media: Singapura; 2006. p. 428-54.

Gomes NM, Rezendeb CM, Fontes SP, Matheus ME, Fernandes PD. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. J Ethnopharm. 2007;109(3):486-92.

Gottlieb OR, Mors WB. A Floresta Brasileira: fabulosa reserva fitoquímica. O Correio da Unesco. 1979;7(9):35-8.

Gottlieb OR, Borin MRMB. Natural Products research in Brazil. Ciência e Cultura. 1997;49(5):315-20.

Gramosa MV, Silveira ER. Volatile constituents of *Copaifera langsdorffii* from the Brazilian northeast. J Essent Oil Res. 2005;17:130-32.

Greay SJ, Ireland DJ, Kissick HT, Heenan PJ, Carson CF, Riley TV, et al. Inhibition of established subcutaneous murine tumour growth with topical *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. Cancer Chemother Pharmacol. 2010;66(6):1095-102.

Grenier D, Bertrand J, Mayrand D. *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles promote bacterial resistance to chlorhexidine. Oral Microbiol Immunol. 1995;10(5):319-20.

Griffen AL, Becker MR, Lyons SR, Moeschberger ML, Leys EJ. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and Periodontal Health Status. J Clin Microbiol. 1998;36(11): 3239-42.

Gustafson JE, Liew YC, Chew S, Markham J, Bell HC, Wyllie SG, Warmington JR. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. Lett Appl Microbiol. 1998;26(3):194-8.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV, Nielsen JB. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. Food Chem Toxicol. 2006;44(5):616-25.

Hammer KA, Dry L, Johnson M, Michalak EM, Carson CF, Riley TV. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18(6):389-92.

Han YW, Shi W, Huang GT, Kinder Haake S, Park NH, Kuramitsu H, Genco RJ. Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. *Infect Immun*. 2000;68(6):3140-6.

Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm Res*. 2000;49(11):619-26.

Hofstad T. The Genus *Fusobacterium*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. *The prokaryotes*. 3rd ed. vol 7. Springer Science+Business Media: Singapura; 2006. p. 1016-28.

Hou, D. Studies in Malesian Caesalpinioideae (Leguminosae). 1. The genera *Acrocarpus*, *Azelia*, *Copaifera* and *Instisia*. *Blumea*. 1994;38: 313-330.

International Organization for Standardization. ISO 4730:2004: Oil of *Melaleuca*, terpinen-4-ol type (tea tree oil). Geneva: ISO; 2004.

Jacobs MR, Hornfeldt CS. *Melaleuca* oil poisoning. *J Toxicol Clin Toxicol*. 1994;32(4):461-4.

Jandourek A, Vaishampayan JK, Vazquez JA. Efficacy of melaleuca oral solution for the treatment of fluconazole refractory oral candidiasis in AIDS patients. *AIDS*. 1998;12(9):1033-7.

Kang R, Helms R, Stout MJ, Jaber H, Chen Z, Nakatsu T. Antimicrobial activity of the volatile constituents of *Perilla frutescens* and its synergistic effects with polygodial. *J Agric FoodChem*. 1992;40(11):2328-30

Khan IA, Abourashed EA. Leung's encyclopedia of common natural ingredients: used in food, drugs and cosmetics. 3rd ed. Hoboken: John Wiley & Sons; 2010.

Kapatral V, Anderson I, Ivanova N, Reznik G, Los T, Lykidis A, et al. Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586. J Bacteriol. 2002;184(7):2005-18.

Kapatral V, Ivanova N, Anderson I, Reznik G, Bhattacharyya A, Gardner WL, et al. Genome analysis of *F. nucleatum* sub spp vincentii and its comparison with the genome of *F. nucleatum* ATCC 25586. Genome Res. 2003;13(6A):1180-9.

Kew Gardens. Index Kewensis. Oxford: Clarendon Press: Oxford; 1996. Supplement XX.

Knorr, M. 1923. Über die fusospirilläre Symbiose, die Gattung *Fusobacterium* (K. B. Lehmann) und *Spirillumputigenum*. II. Mitteilung. Die Gattung *Fusobacterium*. Zbl. Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten Abteilung. 1923;89:4-22.

Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. Periodontol 2000. 2006;42:47-9.

Kulik E, Lenkeit K, Meyer J. Antimikrobielle Wirkung von Teebaumöl (*Melaleuca alternifolia*) auf orale Mikroorganismen. Acta Med Dent Helv. 2000;5:125-30.

Kuyyakanond T, Quesnel LB. The mechanism of action of chlorhexidine. FEMS Microbiol Lett. 1992;79(1-3):211-5.

Lamont RJ, Jenkinson HF. Oral Microbiology at a Glance. 1st ed. Editora John Wiley and Sons; 2010.

Lee SY. Effects of chlorhexidine digluconate and hydrogen peroxide on *Porphyromonas gingivalis* hemin binding and coaggregation with oral streptococci. J Oral Science; 43(17):1-7.

Lindhe J. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. 3rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1999.

Liu PF, Haake SK, Gallo RL, Huang CM. A novel vaccine targeting *Fusobacterium nucleatum* against abscesses and halitosis. *Vaccine*. 2009;27(10):1589-95.

Löe H, Schiott CR. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodontal Res*. 1970;5(2):79-83.

Lopez C, Shanley P, Fantini AC. Riquezas da floresta: frutas, plantas medicinais e artesanato na América Latina. Indonésia: CIFOR; 2008.

Loughlin R, Gilmore BF, McCarron PA, Tunney MM. Comparison of the cidal activity of tea tree oil and terpinen-4-ol against clinical bacterial skin isolates and human fibroblast cells. *Lett Appl Microbiol*. 2008;46(4):428-33

MacDonald V. The rationale of treatment. *Aust J Dent*. 1930;34:281-85.

Machado BFMT. Óleos Essenciais: verificação da ação antimicrobiana in vitro, na água e sobre a microbiota da pele humana [dissertação]. Botucatu (SP): Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2011.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Microbiologia de Brock. 10th ed. São Paulo: Prentice-Hall; 2004. .

Meng H, Xu L, Li Q, Han J, Zhao Y. Determinants of host susceptibility in aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*. 2007;43(1):133-59.

Mestecky J, Bienenstock J, Lamm ME, Mayer L, McGhee JR, Strober W. Mucosal immunology. 3rd ed. Amsterdam: Academic Press; 2005.

Metzger Z, Blasbalg J, Dotan M, Tsesis I, Weiss EI. Characterization of coaggregation of *Fusobacterium nucleatum* PK1594 with six *Porphyromonas gingivalis* strains. *J Endod*. 2009;35(1):50-4.

Millward TA, Wilson M. The effect of sub-inhibitory concentrations of chlorhexidine on the proteolytic activity of *Bacteroides gingivalis*. J Antimicrob Chemother. 1990;25(1):31-7.

Ministério da Saúde. Condições de Saúde Bucal da População Brasileira 2002-2003. 1st ed. Brasília: MS; 2004.

Moore WEC, Moore LVH. The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000. 1994;5(1):66-77.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. [homepage na internet]. Maryland: National Center for Biotechnology Information; 2010 [acesso em 2011a jan 14]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=851&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. [homepage na internet]. Maryland: National Center for Biotechnology Information; 2011 [acesso em 2011b fev 18]. Disponível em: NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=431947&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

Newman MG. Periodontia clínica. .9th ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2004.

Ogawa AT. Caracterização das atividades proteolíticas da bactéria anaeróbia *Fusobacterium nucleatum* [dissertação]. Londrina (PR): Universidade Estadual de Londrina; 2004.

Okamoto AC, Gaetti-Jardim E Junior, Arana-Chavez VE, Avila-Campos MJ. Influence of subinhibitory concentrations of antimicrobials on hydrophobicity, adherence and ultra-structure of *Fusobacterium nucleatum*. Braz J Microbiol. 2002;33(2)

Oliver WW, Wherry WB. Notes on some bacterial parasites of the human mucous membranes. J Infect Dis. 1921;28(4):341-4.

Olsen I, Shah HN, Gharbia SE. Taxonomy and biochemical characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000. 1999;20:14-52.

Oosterwaal PJ, Mikx FH, van den Brink ME, Renggli HH. Bactericidal concentrations of chlorhexidine-digluconate, amine fluoride gel and stannous fluoride gel for subgingival bacteria tested in serum at short contact times. *J Periodontal Res*. 1989;24(2):155-60.

Pasternak, J. Perspectivas e implicações terapêuticas no tratamento da escabiose. *Einstein*. 2008;6(3):380-1.

Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC. Host immune responses to *Porphyromonas gingivalis* antigens. *Periodontol* 2000. 2010;52(1):218-37

Pedreira EM. Avaliação do efeito inibitor tumoral do óleo resina de copaíba in natura (*Copaifera reticulata*) e manipulado artesanalmente no modelo de carcinogênese bucal [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2007.

Peixoto PAS Neto, Caetano LC. Plantas medicinais: do popular ao científico. 1st ed. Alagoas: EDUFAL; 2005.

Pelt JM. A “revolução verde” da medicina. *O Correio da Unesco*. 1979;7(9):8-13.

Penfold AR, Grant R. The germicidal values of some Australian essential oils and their pure constituents, together with those for some essential oil isolates, and synthetics. Part III. *J. R. Soc. New South Wales*. 1925;59:346-49

Penfold AR, Morrison FR. Some notes on the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Aust J Pharm*. 1937;18:274-5.

Pennaforte RJ. Estudo da atividade antiinflamatória de duas espécies de plantas amazônicas [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2003.

Pereira J. The elements of materia medica and therapeutics. 4th ed. London: Spottoswoode & co. New-street Square; 1857.

Petersen PE, Ogawa H. Review Strengthening the Prevention of Periodontal Disease: The WHO Approach. J Periodontol. 2005;76(12):2187-93.

Pieri FA. Efeito (in vitro/in vivo) do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) sobre bactérias formadoras de placa dental em cães (*Canis lupus familiaris*) [dissertação]. Alfenas(MG): Universidade José do Rosário Vellano; 2007.

Pieri FA, José RM, Galvão NN, Nero LA, Moreira MAS. Antimicrobial activity of autoclaved and non autoclaved copaiba oil on *Listeria monocytogenes*. Cienc Rural. 2010b;40(8):1797-801.

Pieri FA, Mussi MC, Moreira MAS. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. Rev bras plantas med. 2009;11(4): 465-72.

Pieri FA, Mussi MC, Fiorini JE; Schneedor JM. Efeitos clínicos e microbiológicos do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) sobre bactérias formadoras de placa dental em cães. Arq Bras Med Vet Zootec. 2010a;62(3):578-85.

Poulet PP, Duffaut D, Lodter JP. Metronidazole susceptibility testing of anaerobic bacteria associated with periodontal disease. J Clin Periodontol. 1999;26(4):261-3.

Prance SG, Nesbitt M. The Cultural History of Plants. 1st ed. New York: aylor & Francis Group; 2005.

Rai B, Kaur J, Anand SC, Jacobs R. Salivary stress markers, stress, and periodontitis: a pilot study. J Periodontol. 2011;82(2):287-92.

Ramacciato JC. Atividade de soluções à base de alho (*Allium sativum*), óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) e clorexidina sobre microrganismos totais e estreptococos do grupo mutans: estudo in vivo [tese]. Piracicaba (SP): Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas; 2000.

Raman A, Weir U, Bloomfield SF. Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis* and *Propionibacterium acnes*. *Lett Appl Microbiol*. 1995;21(4):242-5.

Ramos MFS. Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica [tese]. Ribeirão Preto (SP): Universidade de São Paulo; 2006.

Reynolds MJ; US Patent. Antimicrobial and pesticidal compositions and methods comprising reduced monoterpene oil extracted from myrtaceae. US 2008/0026083. 2008 jan. 24.

Ribeiro L. Medicina no Brasil colonial. 1st ed. Rio de Janeiro: Sul Americana; 1971.

Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms *Trends Microbiol*. 2003;11(2):94-100.

Rigamonte-Azevedo OC, Wadt PGS, Wadt LHO. Copaíba : ecologia e produção de óleo-resina. 1st ed. Rio Branco: Embrapa; 2004.

Rosa JC, Gomes MAS. Os aspectos etnobotânicos da copaíba. *Rev Geografar*. 2009;4(1):59-77.

Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ. Intracellular *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in buccal epithelial cells collected from human subjects. *Infect Immun*. 2001;69(4):2700-7.

Salvador V. História do Brasil. 1st ed. Rio de Janeiro: Biblioteca Nacional, 1889.

Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Junior VF, Pinto AC, Nakamura CV. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103(3):277-81.

Schwabacher H, Lucas DR, Rimington C. *Bacterium melaninogenicum*; a misnomer. *J Gen Microbiol*. 1947;1(2):109-20.

Scientific Committee on Consumer Products. Tea tree Oil. Bruxelas: SCCP; 2004.

Seawright A. Tea tree oil poisoning (comment). *Med J Aust*. 1993;159:831.

Seixas MLB. A natureza brasileira nas fontes portuguesas do século XVI. 1st ed. Portugal: Passagem editores; 2003.

Shah HN, Collins MD. Proposal for Reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a New Genus, *Porphyromonas*. *Int J Syst Bacteriol*. 1988;38(1):128-31.

Shapiro S, Meier A, Guggenheim B. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol*. 1994;9(4):202-8.

Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D. *Fusobacterium nucleatum* in Periodontal Health and Disease. *Curr Issues Mol Biol*. 2011;13(2):25-36.

Slots J, Genco RJ. Black pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival and tissue destruction. *J Dent Res*. 1984;63(3):412-21.

Slots J. Selection of antimicrobial agents in periodontal therapy. *J Periodontal Res*. 2002;37(5):389-98.

Soares AKA, Carmo GC, Quental DP, Nascimento DF, Bezerra FAF, Moraes MO; Moraes MEA. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. *Rev bras farmacogn*. 2006;16(4):447-54.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Junior. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134-44.

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000. 2005;38:135-87.

Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: Current concepts. *J. Periodontol*. 1992;63(4, Suppl):322-31

Sojar HT, Sharma A, Genco RJ. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae bind to cytokeratin of epithelial cells. *Infect Immun*. 2002;70(1):96-101.

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

Tappin MRR, Pereira JFG, Lima LA, Sianil AC, Mazzeill JL, Ramos MFC. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. *Quím Nova*. 2004;27(2):236-40.

Theilade E, Wright WH, Jensen SB, Loe H. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodontal Res* 1966; 1:1-13.

Tribble, G. D. and Lamont, R. J. Bacterial invasion of epithelial cells and spreading in periodontal tissue. *Periodontology* 2000. 2010;52(1):68-83.

Tunér K, Baron EJ, Summanen P, Finegold SM. Cellular fatty acids in *Fusobacterium* species as a tool for identification. *J Clin Microbiol*. 1992;30(12):3225-9.

Van Dyke TE, Offenbacher S, Place D, Dowell VR, Jones J. Refractory periodontitis: mixed infection with *Bacteroides gingivalis* and other unusual *Bacteroides* species. A case report. *J Periodontol*. 1988;59(3):184-9.

Vasconcelos AFF, Godinho OES. Uso de métodos analíticos convencionados no estudo da autenticidade do óleo de copaíba *Quim. Nova*. 2002; 25(6B) 1057-1060.

Veiga VF Junior, Pinto AC. O gênero *Copaifera* L. Quim Nova. 2002;25(2): 273-286.

Vogt M. Doença periodontal e resultados perinatais adversos em uma coorte de gestantes [dissertação]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2006.

Voha C, Docquier JD, Rossolini GM, Fosse T. Genetic and biochemical characterization of FUS-1 (OXA-85), a narrow-spectrum class D beta-lactamase from *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum*. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(8):2673-9.

Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. Ann Rev Microbiol. 1996;50(1):513-552.

World Health Organization. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants. Genebra; 2002. 357 p.

Wright TL, Ellen RP, Lacroix JM, Sinnadurai S, Mittelman MW. Effects of metronidazole on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. J Periodontal Res. 1997;32(5):473-7.

Yilmaz O, Verbeke P, Lamont RJ, Ojcius DM. Intercellular spreading of *Porphyromonas gingivalis* infection in primary gingival epithelial cells. Infect Immun. 2006;74(1):703-10.

Yang HW, Huang YF, Chou MY. Occurrence of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontally diseased and healthy subjects. J Periodontol. 2004;75(8):1077-83.

Yong D, Parker FC, Foran SM. Severe allergic reactions and intra-urethral chlorhexidine gluconate. Med J Aust. 1995;162(5):257-8.

Zambon JJ. Periodontal diseases: microbial factors. Ann Periodontol. 1996;1(1):879-925.