

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Avaliação da atividade de óleos essenciais sobre micro-organismos bucais e  
efeito de formulação de enxaguatório bucal contendo óleo essencial sobre  
biofilme de micro-organismo cariogênico**

Ingrid Pontes de Sousa

Ribeirão Preto  
2014

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Avaliação da atividade de óleos essenciais sobre micro-organismos bucais e efeito de formulação de enxaguatório bucal contendo óleo essencial sobre biofilme de micro-organismo cariogênico**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

**Orientada:** Ingrid Pontes de Sousa

**Orientadora:** Profa. Dra. Nieve Araçari Jacometti Cardoso Furtado

Ribeirão Preto  
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Sousa, Ingrid Pontes de

Avaliação da atividade de óleos essenciais sobre micro-organismos bucais e efeito de formulação de enxaguatório bucal contendo óleo essencial sobre biofilme de micro-organismo cariogênico. Ribeirão Preto, 2014.

107p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Furtado, Nieve Araçari Jacometti Cardoso.

1. óleos essencial. 2. *Aldama arenaria*. 3. micro-organismos cariogênicos  
4. enxaguatório bucal. 5. biofilme.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Ingrid Pontes de Sousa

Avaliação da atividade de óleos essenciais sobre micro-organismos bucais e efeito de formulação de enxaguatório bucal contendo óleo essencial sobre biofilme de micro-organismo cariogênico.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Nieve Araçari Jacometti Cardoso Furtado

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.(a) Dr.(a) \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.(a) Dr.(a) \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedicatória*

*À natureza, que, apesar de tão maltratada pelos homens, ainda nos dá o sol, o ar, a água, a terra... as plantas e os óleos essenciais! É fonte de descobertas e inspiração para novas ideias...*

*“Não evoluímos no planeta, evoluímos com o planeta”*

*Agradecimentos*

**Aos meus pais, pois sem eles nunca teria chegado até aqui.**

Minha mãe, pois sem seu amor, apoio e ajuda, tudo seria mais difícil e a estrada menos colorida. Além do apoio pessoal, contribuiu diretamente para este trabalho, sendo a protética responsável pelo preparo dos blocos dentais utilizados no experimento do biofilme, os quais, como sempre, fez com muita dedicação e esmero.

Meu pai, uma das pessoas mais importantes da minha vida, que sempre incentiva e apoia minhas decisões e me impulsiona a pensar alto. Seu apoio e incentivo foram fundamentais para que eu realizasse minha viagem ao *V Congress of European Microbiologists*, que se deu em Leipzig, na Alemanha.

A vocês, meus mais sinceros agradecimentos! Essa conquista também é de vocês!

**À Professora Dra. Niece Araçari Jacometti Cardoso Furtado,**

Minha orientadora, que acreditou em mim e, felizmente, aceitou me orientar. Pela sua orientação séria e de qualidade, pela sua ternura e carinho, tratando todos seus orientados como “filhos” de maneira tão bonita e especial. Acredito que nada é por acaso e posso dizer que ganhei uma amiga. Obrigada pela paciência, pelos conselhos, pela empolgação e amor pela pesquisa científica, pelas brilhantes ideias e por dividir seu conhecimento a todo o momento, contribuindo para o meu desenvolvimento científico e intelectual.

**Ao Professor Dr. Augusto César Cropanese Spadaro,**

O meu “pai científico”, que me despertou para o mundo da pesquisa, me abriu os caminhos, apontou possibilidades e acreditou em mim. Por sua preocupação e devoção com a pesquisa e o ensino. O senhor é um grande exemplo em minha vida.

“Um professor afeta a eternidade; é impossível dizer até onde vai sua influência” *Henry Adams*

**À técnica Ana Cristina Morseli Polizello,**

Palavras são insuficientes para expressar meu carinho e gratidão por você. Esteve comigo desde os meus primeiros passos na pesquisa científica, nunca hesitou em me auxiliar e transmitir seus conhecimentos práticos e teóricos quando precisei. Também me auxiliou no Programa PAE e me ensinou que é possível trabalhar com produtividade e harmonia. Alegrou os meus dias com sua presença serena e amável, com seu bom humor e com seus quitutes de surpresa, sempre deliciosos! É um exemplo de profissional e ser humano, que compartilha tudo o que sabe e se doa para o próximo de coração.

Obrigada por tudo, você é o que eu quero ser quando crescer!

**À técnica Maria Angélica dos Santos Cunha Chellegatti,**

Pela sua dedicação e persistência, pela sua ajuda incansável com os experimentos, por manter a organização do laboratório e fazer dele um lugar melhor para se trabalhar. Por corrigir os erros que só ela é capaz de perceber, pelos intervalos de descontração na cantina, pelas demonstrações de carinho e preocupação a cada dia, pelos lanchinhos que viraram almoço no dia seguinte! Trabalhar ao seu lado me propiciou momentos de muita alegria e aprendizado, e posso dizer que descobri um ser humano com um coração de ouro.

“Quem tem Gelly, tem tudo e um pouco mais!” Obrigada!

**Ao Núcleo de Tecnologia em Saúde da Universidade Federal da Bahia** e à aluna de Iniciação Científica **Gessyka Rayana Pereira**, pela realização da etapa de formulação e caracterização físico-química da microemulsão.

À aluna de Iniciação Científica **Erika Reiko Hashimoto Kawakita**, pela valiosa colaboração em alguns experimentos deste trabalho.

Ao **Professor Dr. Fernando Batista da Costa**, pelo fornecimento de algumas plantas estudadas nesta pesquisa.

Aos técnicos:

**Luciana Ceribelli**, sem você não teria sido a mesma coisa, obrigada pela amizade e por alegrar os meus dias!

**Alcides Silva Pereira**, por estar sempre disposto a ajudar e pelas boas histórias.

**Nadir Mazzucato**, pelo auxílio com os materiais do laboratório, pela preocupação com os alunos e pelos deliciosos chás de gengibre no meio da tarde.

**Agnaldo Fernando Baldo da Silva**, pela fonte inesgotável de conhecimentos (principalmente em química) e pela ajuda sempre que necessário.

**Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini**, pela valiosa colaboração no Programa PAE.

**Ieda Maria Razaboni Prado**, pelos sorrisos e colaboração sempre que necessário.

**Mário Sadaiti Ogasawara** e **Walter Lopes**, pelo valioso auxílio e dicas na extração dos óleos essenciais.

**Luciana Angulo Faria Rocha**, pela colaboração na realização do experimento do biofilme.

**Izabel Cristina Casanova Turatti**, pelo auxílio com as análises de CG-EM.

Aos queridos amigos do Laboratório de Farmacognosia e Bioquímica

**Felippe, Micássio, Ana Carolina, Rodolfo, Ana Paula, Everton, Andréa, Larissa, Erick, Federico, Dani Chagas, Danni, Ju, Cris, Eli, Mariza, Camila, Marcela, Mari, Tati, Rejane, Rosana e João Luiz**, pela boa convivência e alto astral!

Em especial ao mestrando **Felipe Antunes dos Santos**, pela companhia nas coletas, pelas discussões teóricas/filosóficas sobre o mundo e pela ajuda com os experimentos de estatística multivariada.

Ao doutorando **Bruno Leite Sampaio**, pelas coletas da Tithonia.

Ao mestrando **Vitor Francisco dos Santos**, por compartilhar desde o início as certezas e incertezas, as alegrias e tristezas dessa experiência chamada pós-graduação.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho (processo 2012/01429-8).

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pela bolsa inicialmente concedida.

Aos **funcionários da Seção de Pós-graduação e toda a estrutura da FCFRP-USP**, por viabilizarem a realização deste trabalho.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP**, pelo excelente ensino e programa de pesquisa e extensão oferecidos.

Aos **funcionários da guarda e da limpeza da FCFRP-USP**, pelos imprescindíveis trabalhos de segurança e limpeza da faculdade. Em especial à **D. Vera Lúcia**, por manter o laboratório impecavelmente limpo, pelas boas histórias e risadas!

A todos aqueles que, embora não citados, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

*Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe.*

*(Leonardo da Vinci)*

## RESUMO

SOUSA, I. P. **Avaliação da atividade de óleos essenciais sobre micro-organismos bucais e efeito de formulação de enxaguatório bucal contendo óleo essencial sobre biofilme de micro-organismo cariogênico.** 2014. 107f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A utilização de enxaguatórios bucais é um recurso importante na manutenção da saúde oral, uma vez que esta pode suprir as limitações da higienização tradicional mecânica, devido ao maior acesso às bactérias do biofilme dental. Em função de sua fácil utilização, palatabilidade e poder de refrescância, os enxaguatórios podem ser considerados um produto de fácil adesão, sendo especialmente importantes na manutenção da saúde bucal de usuários com menor destreza ou impossibilidade de realizar uma escovação adequada. Entre os diversos componentes ativos que podem estar presentes nos enxaguatório bucais estão os constituintes de óleos essenciais como mentol, eucaliptol e timol. Uma grande vantagem da utilização de óleos essenciais em produtos para saúde bucal é a existência de uma gama de propriedades biológicas e organolépticas que os mesmos podem conferir às formulações, uma vez que podem atuar como agentes antimicrobianos, inibidores da produção de ácidos e sulfetos voláteis por bactérias orais, antioxidantes, anti-inflamatórios, aromatizantes e flavorizantes simultaneamente. Dessa forma, formulações contendo óleos essenciais podem ser potenciais agentes na prevenção e tratamento das afecções bucais mais comuns como a cárie dental, placa, tártaro, gengivite, periodontite e halitose. O presente trabalho teve por objetivo inicial realizar um estudo comparativo das atividades antimicrobianas e anticariogênicas dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Illicium verum*, *Zingiber officinale*, *Eucalyptus globulus*, *Tithonia diversifolia* e *Aldama arenaria*, por meio da determinação de suas concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações bactericidas mínimas (CBM) e através da medida potenciométrica do pH de suspensões bacterianas, as quais foram tratadas com concentrações seriadas dos óleos essenciais. Entre os componentes voláteis analisados, o óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* demonstrou-se o mais promissor, apresentando-se ativo contra *S. mutans* (CIM = 15,6 µg/mL e CBM = 62,5 µg/mL) e *S. mitis* (CIM = 31,2 µg/mL e CBM = 31,2 µg/mL) e moderadamente ativo contra *L. casei* (CIM = 125µg/mL e CBM = 250 µg/mL) e *S. salivarius* (CIM = 250 µg/mL e CBM = 250 µg/mL). A concentração capaz de inibir 50% da produção de ácidos orgânicos por *S. mutans* foi de 26,5 µg/mL. Este óleo essencial foi caracterizado quimicamente e avaliado quanto à sua segurança para incorporação em produtos de higiene bucal. Os principais componentes majoritários identificados foram os sesquiterpenos carotol (12,67%), falcarinol (6,71%) e espatulenol (5,48%). Quanto à citotoxicidade, não foi observado efeito anti-proliferativo do óleo essencial em fibroblastos gengivais humanos tratados com concentrações iguais ou menores que 250 µg/mL, após 30 minutos de exposição. Assim, esta concentração de óleo essencial foi escolhida para ser veiculada na microemulsão de enxaguatório bucal. A microemulsão obtida apresentou-se como um sistema translúcido e estável, de densidade relativa 1,22 g/mL, viscosidade de 2,28 cP, tamanho de gotícula 24,96 nm, condutividade 1.246,67 µS/cm e pH final igual a 6,56. Embora o sistema da microemulsão tenha sido caracterizado como físico-quimicamente estável, por meio de análise cromatográfica foi possível constatar que óleo não se encontrava homoganeamente disperso no sistema. Considerando a não homogeneidade da formulação e, visando determinar o real potencial do óleo essencial, optou-se por avaliar seu efeito isoladamente sobre o biofilme de *S. mutans*. Em concentrações equivalentes a 250 e

1.000 µg/mL, o óleo essencial não apresentou atividade inibitória sobre o crescimento e a produção de ácidos dos micro-organismos sésseis. No entanto, a atividade significativa contra a proliferação e a produção de ácidos orgânicos de *S. mutans* planctônico, o qual é considerado um dos principais iniciadores do processo de formação da cárie e do próprio biofilme, abrem perspectivas para a aplicação dos constituintes deste óleo essencial em formulações de enxaguatórios bucais.

**Palavras-chave:** óleos essenciais, *Aldama arenaria*, micro-organismos cariogênicos, enxaguatório bucal, biofilme.

## ABSTRACT

SOUSA, I. P. **Evaluation of essential oils activity against oral microorganisms and effect of mouthwash containing essential oil upon cariogenic microorganism biofilm.** 2014. 107f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The use of mouthwashes are an important resource in maintaining oral health as it can overcome the limitations of traditional mechanical cleaning because of their greater access to bacterial biofilm. Due to their ease of use, palatability and freshness, mouthwashes are considered as products of easy adhesibility, being especially important in maintaining oral health of users with less dexterity or inability to perform a proper teeth brushing. Among the several active components which may compose mouthwashes are the constituents from essential oils such as menthol, eucalyptol and thymol. A major advantage of the use of essential oils in oral health products is the range of biological and organoleptic properties that can be conferred to the formulations, once these oils can work as antimicrobials that inhibit the production of acids and volatile sulfides by oral bacteria, also as antioxidants, anti-inflammatory and flavoring agents simultaneously. Thus, essential oil containing formulations can work for preventing and treating the most common oral diseases such as dental caries, plaque, tartar, gingivitis, periodontitis and halitosis. The initial goal of the present work was to conduct a comparative study of antimicrobial and anticariogenic activities of essential oils extracted from *Cymbopogon citratus*, *Illicium verum*, *Zingiber officinale*, *Eucalyptus globulus*, *Tithonia diversifolia* and *Aldama arenaria*, by determining their minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC) and by the potentiometric measurement of the pH from bacterial suspensions treated with serial essential oils concentrations. Among the volatile compounds analyzed, the essential oil from *A. arenaria* inflorescences was considered the most promising, for being active against *S. mutans* (MIC = 15.6 µg/ml and MBC = 62.5 µg/ml) and *S. mitis* (MIC = 31.2 µg/ml and MBC = 31.2 µg/ml) and moderately active against *L. casei* (MIC = 125 µg/mL and CBM = 250 µg/ml) and *S. salivarius* (MIC = 250 µg/ml and MBC = 250 µg/ml). The concentration that inhibits 50% of organic acids production by *S. mutans* was determined as 26.5 µg/mL. This essential oil was chemically characterized and evaluated about its safety for incorporation in oral hygiene products. The major identified constituents were the sesquiterpenes carotol (12.67%), falcarinol (6.71%) and spathulenol (5.48 %). The essential oil displayed no anti-proliferative effects against human gingival fibroblasts treated during 30 minutes with concentrations up to 250 µg/mL. Thus, this concentration of essential oil was chosen to be conveyed in the microemulsion mouthwash. The microemulsion was characterized as a translucent and stable system, with 1.22 g/ml relative density, 2.28 cP viscosity, 24.96 nm droplet size, 1246.67 µS/cm of conductivity and final pH 6.56. Although characterized as a physical-chemically stable system, through a chromatograph analysis it was found that the oil was not homogeneously dispersed in the system. Considering the inhomogeneity of the formulation and, in order to determine the real potential of the essential oil, it was decided to evaluate the isolated effect of the oil against *S. mutans* biofilm. The essential oil displayed no inhibitory activity on the growth and acid production of sessile microorganisms at concentrations equal to 250 and 1,000 µg/mL. However, the significant activity against proliferation and organic acid production of planktonic *S. mutans*, which is considered one of the main initiators of dental caries process and biofilms,

indicated good perspectives for its constituents application in mouthwashes formulations.

**Keywords:** essential oils, *Aldama arenaria*, cariogenic microorganisms, mouthwash, biofilm.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Reação de oxirredução da resazurina.....	14
<b>Figura 2.</b> Reação de conversão do sal do MTT em sal de formazan.....	19
<b>Figura 3.</b> Atividade inibitória dos óleos essenciais em concentração de 25 µ/mL, sobre a produção de ácidos por <i>S. mutans</i> ATCC 25175.....	33
<b>Figura 4.</b> (A) Queda do pH do meio de suspensão de <i>S. mutans</i> ATCC 25175 tratados com concentrações seriadas do óleo essencial das folhas de <i>Cymbopogon citratus</i> (B) Curva dose-efeito da concentração de óleo essencial <i>versus</i> efeito da atividade inibitória sobre o potencial acidogênico bacteriano.....	34
<b>Figura 5.</b> (A) Queda do pH do meio de suspensão de <i>S. mutans</i> ATCC 25175 tratados com concentrações seriadas do óleo essencial dos frutos de <i>Ilicium verum</i> (B) Curva dose-efeito da concentração de óleo essencial <i>versus</i> efeito da atividade inibitória sobre o potencial acidogênico bacteriano.....	35
<b>Figura 6.</b> (A) Queda do pH do meio de suspensão de <i>S. mutans</i> ATCC 25175 tratados com concentrações seriadas do óleo essencial das folhas de <i>Eucalyptus globulus</i> (B) Curva dose-efeito da concentração de óleo essencial <i>versus</i> efeito da atividade inibitória sobre o potencial acidogênico bacteriano.....	36
<b>Figura 7.</b> (A) Queda do pH do meio de suspensão de <i>S. mutans</i> ATCC 25175 tratados com concentrações seriadas do óleo essencial dos rizomas de <i>Zingiber officinale</i> (B) Curva dose-efeito da concentração de óleo essencial <i>versus</i> efeito da atividade inibitória sobre o potencial acidogênico bacteriano.....	37
<b>Figura 8.</b> (A) Queda do pH do meio de suspensão de <i>S. mutans</i> ATCC 25175 tratados com concentrações seriadas do óleo essencial das folhas de <i>Tithonia diversifolia</i> (B) Curva dose-efeito da concentração de óleo essencial <i>versus</i> efeito da atividade inibitória sobre o potencial acidogênico bacteriano.....	38
<b>Figura 9.</b> (A) Queda do pH do meio de suspensão de <i>S. mutans</i> ATCC 25175 tratados com concentrações seriadas do óleo essencial das inflorescências de <i>Tithonia diversifolia</i> (B) Curva dose-efeito da concentração de óleo essencial <i>versus</i> efeito da atividade inibitória sobre o potencial acidogênico bacteriano.....	39
<b>Figura 10.</b> (A) Queda do pH do meio de suspensão de <i>S. mutans</i> ATCC 25175 tratados com concentrações seriadas do óleo essencial das folhas de <i>Aldama arenaria</i> (B) Curva dose-efeito da concentração de óleo essencial <i>versus</i> efeito da atividade inibitória sobre o potencial acidogênico bacteriano.....	40

<b>Figura 11.</b> (A) Queda do pH do meio de suspensão de <i>S. mutans</i> ATCC 25175 tratados com concentrações seriadas do óleo essencial das inflorescências de <i>Aldama arenaria</i> (B) Curva dose-efeito da concentração de óleo essencial <i>versus</i> efeito da atividade inibitória sobre o potencial acidogênico bacteriano.....	41
<b>Figura 12.</b> Inflorescências de <i>Aldama arenaria</i> coletadas na Rodovia Washington Luiz, S.P., km 223.....	43
<b>Figura 13.</b> Cromatogramas dos óleos essenciais das inflorescências de <i>Aldama arenaria</i> coletadas em (A) fevereiro de 2012, (B) fevereiro de 2013 e (C) fevereiro de 2014, obtidos por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas.....	44
<b>Figura 14.</b> Estruturas químicas dos constituintes majoritários (A) carotol (12,67%), (B) falcarinol (6,71%) e (C) espatulenol (5,48%), identificados no óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i> coletadas em fevereiro de 2012.....	48
<b>Figura 15.</b> Estruturas químicas dos constituintes majoritários (A) palustrol (25,13%), (B) limoneno (11,76%) e (C) teresantalolol (5,13%), identificados no óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i> coletadas em fevereiro de 2013.....	48
<b>Figura 16.</b> Estruturas químicas dos constituintes majoritários (A) limoneno (19,88%), (B) $\beta$ -mierceno (8,64%) e (C) espatulenol (6,39%), identificados no óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i> coletadas em fevereiro de 2014.....	48
<b>Figura 17.</b> (A) Efeitos sobre a viabilidade de fibroblastos gengivais humanos após 30 min de incubação com concentrações seriadas de óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i> , avaliados pelo método MTT. (B) Curva dose-efeito da concentração de óleo essencial <i>versus</i> porcentagem de viabilidade celular.....	49
<b>Figura 18.</b> Efeitos sobre a viabilidade de fibroblastos gengivais humanos após 30 min de incubação com dimetilsulfóxido (DMSO 1%), dodecilsulfato de sódio (SDS 20%) e digluconato de clorexidina (DCHX 0,12%), avaliados pelo método do MTT.....	50
<b>Figura 19.</b> Diagrama de fases pseudo-ternário formado por PEG40/Sorbitol/Glicerol (1:1:1), óleo de canola e água.....	51
<b>Figura 20.</b> Comportamento reológico da formulação de enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de <i>Aldama arenaria</i> , com utilização de <i>spindle</i> SC4-18.....	53
<b>Figura 21.</b> Cromatogramas das frações acetato obtidas por partição da (A) formulação de bucal contendo óleo essencial (B) formulação de enxaguatório bucal base (todos os componentes exceto óleo essencial), obtidos por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas.....	53

<b>Figura 22.</b> Cromatogramas das frações hexânicas obtidas por partição da (A) formulação de enxaguarório bucal contendo óleo essencial (B) formulação de enxaguarório bucal base (todos os componentes exceto óleo essencial), obtidos por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas.....	55
<b>Figura 23.</b> Cromatograma da amostra hidrodestilada de enxaguarório bucal contendo 1 mg/mL de óleo essencial das inflorescências de <i>Aldama arenaria</i> , obtido por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas.....	57
<b>Figura 24.</b> Efeitos sobre a viabilidade de <i>S. mutans</i> após 0 min, 10 min, 30 min e 24 h de incubação com diferentes amostras.....	60
<b>Figura 25.</b> Efeitos sobre a viabilidade de fibroblastos gengivais humanos após 30 min de incubação com diluições seriadas de enxaguarório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i> e Periogard <sup>®</sup> , avaliados pelo método MTT.....	61
<b>Figura 26.</b> Curvas das medidas do pH do meio de cultura durante a incubação de biofilmes de <i>S. mutans</i> com diferentes amostras.....	64
<b>Figura 27.</b> Gráfico de dispersão (OPLS-DA) das espécies vegetais analisadas.....	66
<b>Figura 28.</b> Gráfico de variáveis importantes na projeção (OPLS-DA) dos constituintes químicos das espécies vegetais analisadas.....	66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Espécies vegetais e suas partes utilizadas no estudo, suas datas de coleta e registro dos lotes.....	13
<b>Tabela 2.</b> Espécies de micro-organismos utilizados nos ensaios de atividade antimicrobiana e suas características.....	15
<b>Tabela 3.</b> Espécies vegetais utilizadas, suas massas, massas dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação e rendimento em porcentagem (% m/m) do processo de extração.....	31
<b>Tabela 4.</b> Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais de diferentes espécies vegetais e do controle dicloridrato de clorexidina sobre micro-organismos bucais.....	32
<b>Tabela 5.</b> Substâncias identificadas no óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i> coletadas em fevereiro de 2012.....	45
<b>Tabela 6.</b> Substâncias identificadas no óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i> coletadas em fevereiro de 2013.....	46
<b>Tabela 7.</b> Substâncias identificadas no óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i> coletadas em fevereiro de 2014.....	47
<b>Tabela 8</b> Composição final da formulação de enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de <i>Aldama arenaria</i> .....	52
<b>Tabela 9.</b> Caracterização físico-química da formulação de enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de <i>Aldama arenaria</i> .....	52
<b>Tabela 10.</b> Massas extraídas nas partições com n-hexano e acetato de etila dos enxaguatórios bucais com e sem óleo essencial.....	53
<b>Tabela 11.</b> Substâncias identificadas na fração acetato de etila obtida por partição líquido-líquido da formulação do enxaguatório contendo óleo essencial.....	56
<b>Tabela 12</b> Substâncias identificadas na fração acetato de etila obtida por partição líquido-líquido da formulação do enxaguatório base sem óleo essencial.....	56
<b>Tabela 13.</b> Substâncias identificadas na fração acetato hexânica obtida por partição líquido-líquido da formulação do enxaguatório contendo óleo essencial.....	56
<b>Tabela 14.</b> Substâncias identificadas na fração hexânica obtida por partição líquido-líquido da formulação do enxaguatório base sem óleo essencial.....	56
<b>Tabela 15.</b> Substâncias identificadas na amostra hidrodestilada da formulação de enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i> .....	58

<b>Tabela 16.</b> Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do enxaguatório bucal, suas frações orgânicas obtidas por partição líquido-líquido e do controle dicloridrato de clorexidina, para o micro-organismo <i>S. mutans</i> .....	59
<b>Tabela 17.</b> Análise microbiológica dos biofilmes de <i>S. mutans</i> formados em dentes bovinos após exposição a diferentes tratamentos.....	62
<b>Tabela 18.</b> Concentrações de polissacarídeos extracelulares solúveis e insolúveis e polissacarídeos intracelulares dos biofilmes de <i>S. mutans</i> formados em dentes bovinos após diferentes tratamentos.....	63
<b>Tabela 19.</b> Medidas de pH do meio de cultura durante a incubação de biofilmes de <i>S. mutans</i> com diferentes tratamentos.....	64
<b>Tabela 20.</b> Componentes químicos dos óleos essenciais das espécies analisadas correlacionados com a resposta “ativo” na projeção (OPLS-DA).....	67

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AI	Área integrada da curva
ANOVA	Analysis of variance
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração bactericida mínima
CHX	Dicloridrato de clorexidina
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50% do efeito
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DCHX	Digluconato de clorexidina
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
FDA	Food and Drug Administration
IK	Índice de Kovats
IS	Índice de similaridade
LMW	Low Molecular Weight
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
OE	Óleo essencial
PEG 40	Óleo de rícino hidrogenado etoxilado
TSB	Tryptic Soy Broth
UFC	Unidades formadoras de colônia

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	i
<b>Abstract</b> .....	iii
<b>Lista de figuras</b> .....	v
<b>Lista de tabelas</b> .....	viii
<b>Lista de abreviaturas e siglas</b> .....	x
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Biofilmes e a microbiota oral.....	2
1.2. Cárie dental e <i>Streptococcus mutans</i> .....	4
1.3. Manutenção da saúde bucal e enxaguatórios bucais.....	5
1.4. Óleos essenciais.....	7
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	10
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	12
3.1. Procedimentos fitoquímicos.....	13
3.1.1. Material vegetal.....	13
3.1.2. Extração dos óleos essenciais.....	13
3.2. Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos óleos essenciais.....	14
3.2.1. Micro-organismos utilizados.....	14
3.2.2. Preparo do inóculo.....	15
3.2.3. Preparo das amostras e do antimicrobiano padrão.....	15
3.2.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	16
3.2.5. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	16
3.3. Efeito dos óleos essenciais sobre o potencial acidogênico de <i>S. mutans in vitro</i> e determinação das curvas dose-efeito.....	16
3.4. Seleção do óleo essencial.....	18
3.5. Análise fitoquímica do óleo essencial selecionado.....	18
3.6. Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial selecionado.....	19
3.6.1. Cultura de células e condições de cultivo.....	20
3.6.2. Realização da técnica.....	20

3.7. Preparo e caracterização do enxaguatório bucal contendo óleo essencial selecionado.....	21
3.7.1. Preparo da microemulsão .....	21
3.7.2. Caracterização físico-química da microemulsão.....	21
3.7.2.1. <i>Microscopia de luz polarizada</i> .....	21
3.7.2.2. <i>Tamanho das gotículas</i> .....	21
3.7.2.3. <i>Índice de refração</i> .....	22
3.7.2.4. <i>Potencial Zeta</i> .....	22
3.7.2.5. <i>Condutividade</i> .....	22
3.7.2.6. <i>Densidade</i> .....	22
3.7.2.7. <i>Reologia</i> .....	23
3.7.2.8. <i>pH</i> .....	23
3.7.2.9. <i>Centrifugação</i> .....	23
3.8. Avaliação da dispersão do óleo essencial no enxaguatório bucal.....	23
3.8.1. Fracionamento do enxaguatório bucal contendo óleo essencial por partição líquido-líquido.....	23
3.8.2. Hidrodestilação do enxaguatório bucal contendo óleo essencial.....	24
3.8.3. Análise fitoquímica das frações obtidas por partição líquido-líquido e hidrodestilação do enxaguatório bucal contendo óleo essencial.....	24
3.9. Avaliação da atividade antimicrobiana do enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i> e de suas frações obtidas por partição líquido-líquido.....	24
3.10. Determinação do tempo de morte celular em culturas de <i>S. mutans</i> tratadas com o enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i>	25
3.11. Avaliação da citotoxicidade do enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i> .....	25
3.12. Efeito da formulação de enxaguatório bucal contendo óleo essencial selecionado sobre a formação de biofilme de <i>S. mutans</i> .....	25
3.12.1. Preparo dos blocos dentais.....	26
3.12.2. Preparo do biofilme.....	26
3.12.3. Viabilidade bacteriana do biofilme.....	27
3.12.4. Extração de polissacarídeos.....	27

3.12.5. Determinação de polissacarídeos.....	28
3.13. Aplicação de método estatístico multivariado aos dados químicos (OPLS-DA)...	28
3.14. Análise estatística.....	29
<b>4. RESULTADOS</b> .....	30
4.1. Obtenção dos óleos essenciais.....	31
4.2. Avaliação da atividade antimicrionana <i>in vitro</i> dos óleos essenciais.....	31
4.3. Efeito dos óleos essenciais sobre o potencial acidogênico de <i>S. mutans in vitro</i> e determinação das curvas dose-efeito.....	33
4.4. Seleção do óleo essencial.....	42
4.5. Análise fitoquímica do óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i> .....	43
4.6. Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i> ..	49
4.7. Preparo e caracterização do enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i> .....	50
4.7.1. Formulação do enxaguatório bucal.....	50
4.7.2. Caracterização físico-química da microemulsão.....	52
4.8. Avaliação da dispersão do óleo essencial no enxaguatório bucal.....	53
4.8.1. Fracionamento do enxaguatório bucal contendo óleo essencial por partição líquido-líquido e caracterização química das frações orgânicas.....	53
4.8.2. Hidrodestilação do enxaguatório bucal contendo óleo essencial e caracterização química da fração hidrodestilada.....	57
4.9. Avaliação da atividade antimicrobiana do enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i> e de suas frações obtidas por partição líquido-líquido.....	58
4.10. Determinação do tempo de morte celular em culturas de <i>S. mutans</i> tratadas com o enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i>	59
4.11. Avaliação da citotoxicidade do enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i> .....	60
4.12. Efeito da formulação de enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i> sobre a formação do biofilme de <i>S. mutans</i> .....	62
4.12.1. Viabilidade bacteriana do biofilme.....	62
4.12.2. Determinação de polissacarídeos.....	63
4.12.3. Determinação do pH do biofilme bacteriano.....	63
4.13. Aplicação de método estatístico multivariado aos dados químicos (OPLS-DA)...	65

<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	68
5.1. Obtenção dos óleos essenciais.....	69
5.2. Avaliação da atividade antimicrionana <i>in vitro</i> dos óleos essenciais.....	70
5.3. Efeito dos óleos essenciais sobre o potencial acidogênico de <i>S. mutans in vitro</i> .....	70
5.4. Seleção do óleo essencial.....	71
5.5. Análise fitoquímica do óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i> .....	72
5.6. Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i> ..	74
5.7. Preparo e caracterização do enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i> .....	75
5.7.1. Formulação do enxaguatório bucal.....	75
5.7.2. Caracterização físico-química da microemulsão.....	77
5.8. Avaliação da dispersão do óleo essencial no enxaguatório bucal.....	79
5.8.1. Fracionamento do enxaguatório bucal contendo óleo essencial por partição líquido-líquido e caracterização química das frações orgânicas.....	79
5.8.2. Hidrodestilação do enxaguatório bucal contendo óleo essencial e caracterização química da fração hidrodestilada.....	80
5.9. Avaliação da atividade antimicrobiana do enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i> e de suas frações obtidas por partição líquido-líquido.....	81
5.10. Determinação do tempo de morte celular em culturas de <i>S. mutans</i> tratadas com o enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i>	83
5.11. Avaliação da citotoxicidade do enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i> .....	83
5.12. Efeito da formulação de enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de <i>A. arenaria</i> sobre a formação do biofilme de <i>S. mutans</i> .....	85
5.12.1. Viabilidade bacteriana do biofilme.....	87
5.12.2. Determinação de polissacarídeos.....	88
5.12.3. Determinação do pH do biofilme bacteriano.....	90
5.13. Aplicação de método estatístico multivariado aos dados químicos (OPLS-DA)...	90
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	92
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	95

# *Introdução*

## **1. Introdução**

### **1.1. Biofilmes e a microbiota oral**

Ao longo dos últimos dois milhões de anos, os seres humanos e seus micro-organismos comensais evoluíram conjuntamente e tornaram-se gradualmente dependentes uns dos outros (LEY et al., 2008). No início da década de 90, os cientistas acreditavam que o sequenciamento do genoma humano seria o suficiente para entender as bases e o funcionamento do nosso organismo. No entanto, atualmente é sabido que a análise do genoma humano é apenas uma introdução à composição genética de nossos corpos, em função do vasto microbioma que nos habita (AVILA; OJCIUS; YILMAZ, 2009). Registros fósseis indicam que os micro-organismos formavam comunidades espacialmente organizadas há aproximadamente 3,25 bilhões de anos (ALLWOOD et al., 2006). Essas comunidades, também denominadas biofilmes, iniciam-se com a adesão de colonizadores primários a uma superfície biótica ou abiótica, a partir de sinais específicos como a disponibilidade de nutrientes do meio, temperatura, osmolaridade, pH e concentrações de ferro e oxigênio (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000; MARSH, 2005).

A interação inicial é fundamentalmente controlada por interações iônicas e hidrofóbicas entre a parede celular do colonizador e as moléculas adsorvidas na superfície (MILLEZI, 2012). Após a colonização primária, ocorre a agregação de colonizadores secundários (interação célula-célula) através da liberação de proteínas de adesão e polissacarídeos pelas células aderidas, seguida pela deposição de multicamadas microbianas (MARINHO; ARAÚJO, 2007). A etapa seguinte é caracterizada pelo aumento da densidade celular e espessura do biofilme, devido tanto a multiplicação dos micro-organismos aderidos quanto pela adesão de novos micro-organismos. Por fim, atingida a etapa de maturação desse complexo dinâmico e tridimensional, a massa bacteriana é liberada e os micro-organismos desprendidos podem colonizar novos ambientes (MILLEZI, 2012).

Os biofilmes não incluem somente micro-organismos, uma vez que são constituídos principalmente de água e matéria orgânica, a qual corresponde todo material extracelular produzido, bem como qualquer material aprisionado dentro da matriz resultante, como partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas (MACÊDO, 2000).

A transição de células planctônicas (livres) para células organizadas em comunidades aderidas a uma superfície promovem diversas mudanças e adaptações como a expressão de grandes quantidades de exopolissacarídeos para formação da matriz extracelular, alteração da

expressão gênica e indução de um fenótipo do biofilme, resposta a condições de *stress* e comunicação com o hospedeiro (MARSH; MOTER; DEVINE, 2011).

Os exopolissacarídeos são considerados componentes chave que determinam a estrutura e integridade funcional do biofilme microbiano, agindo como adesivos e barreira defensiva, protegendo as células para que não sejam destacadas pelo fluxo de substâncias (KIVES; ORGAZ; SANJOSÉ, 2006). Assim, os polissacarídeos extracelulares podem contribuir para a patogenicidade do biofilme por aumentar o acúmulo de células sobre sua superfície, promover sua estabilização estrutural, facilitar a difusão de nutrientes entre os micro-organismos e dificultar a penetração de agentes antimicrobianos (KOO; XIAO; KLEIN, 2009; BOWEN, 2002).

Evidências experimentais demonstram que micro-organismos em biofilmes são menos suscetíveis aos tratamentos convencionais do que micro-organismos planctônicos e, na maioria dos casos, células de um biofilme podem se tornar 10 a 1.000 vezes mais resistentes aos efeitos dos agentes antimicrobianos (MAH; O'TOOLE, 2001). Segundo Ren e colaboradores, 2005, 40% das proteínas da parede celular de micro-organismos em biofilme diferem das proteínas de células planctônicas, que conseqüentemente modifica possíveis sítios específicos de ligação aos antibióticos. Logo, a organização em biofilmes confere certas vantagens quando comparadas a células livres, como a proteção a determinados antibióticos, desinfetantes e ambientes dinâmicos (MILLEZI, 2012).

Um exemplo de uma das organizações microbianas mais complexas do corpo humano é a microbiota oral, constituída por aproximadamente 700 espécies bacterianas (AAS et al., 2005) e, em menor proporção, vírus, micoplasmas, fungos e protozoários (MARSH; MOTER; DEVINE, 2011).

Na cavidade oral, a qual é quente e úmida, existem diversas superfícies propícias à formação de um biofilme multiespécie, tais como o esmalte dental, as próprias células epiteliais, os colonizadores primários ou as superfícies de materiais ortodônticos presentes na cavidade (JENKINSON; LAMONT, 2005). Essas superfícies possuem macromoléculas hidrofóbicas adsorvidas, como proteínas e glicoproteínas salivares, formando um filme condicionante denominado película adquirida, o qual é propício à adesão bacteriana (ZANATTA; RÖSING, 2007). Cerca de 80% dos colonizadores primários da cavidade oral são do gênero *Streptococcus* (KOLEMBRANDER; WILLIAMS, 1983).

Apesar de a cavidade oral ser aeróbica, o oxigênio presente é rapidamente consumido pelos colonizadores primários aeróbicos (por exemplo, *Neisseria spp.*) ou anaeróbicos facultativos (por exemplo, *Streptococcus* e *Actinomyces ssp.*). Logo, em biofilmes de alta

densidade celular como a placa dental, as condições também são favoráveis para colonização de micro-organismos anaeróbios, resultando em uma organização espacial precisa de interações bacterianas (MARSH; MOTER; DEVINE, 2011). Assim, nas camadas mais superficiais do biofilme estão presentes micro-organismos aeróbios; nas zonas de transição predominam bactérias facultativas tolerantes a oxigênio, como fermentadoras e denitrificantes; enquanto nas partes mais profundas e com potencial redox mais baixo, encontram-se bactérias estritamente anaeróbias, como as sulfato-redutoras e metanogênicas (DAMGAARD; NIELSEN; REVSBECH, 2001).

Vale ressaltar a importância do controle do volume e da complexidade do biofilme oral, uma vez que estes aspectos estão relacionados com doenças periodontais como gengivite crônica e periodontites, halitose, infecções endodônticas, actinomicose e até mesmo à endocardite bacteriana (WILSON, 2005).

## **1.2. Cárie dental e *Streptococcus mutans***

Em condições de equilíbrio, a colonização microbiana dos dentes é benéfica, uma vez que são estabelecidas relações de simbiose com o hospedeiro e a microbiota atua como uma defesa natural da cavidade bucal contra a instalação de micro-organismos patogênicos. Todavia, perturbações no habitat microbiano podem estabelecer relações de patogenicidade através da alteração da composição química do biofilme dental (MARSH; BRADSHAW, 1997). É sabido que em situações de flutuações bruscas de pH, baixo fluxo salivar e excesso de nutrientes disponíveis, determinadas espécies como *Streptococcus mutans* podem se utilizar de mecanismos bioquímicos sofisticados que levam sua seleção natural em detrimento das demais espécies microbianas residentes (LEMON; ABRANCHES; BURNE, 2005).

Os carboidratos provenientes da dieta alimentar, sobretudo sacarose e glucose, constituem a principal fonte energética para *S. mutans*, e a metabolização destes substratos leva a formação de compostos ácidos capazes de reduzir o pH do biofilme a valores abaixo do pH crítico (5,5) de solubilização de hidroxiapatita, principal mineral constituinte do esmalte dental. Este processo tem como consequência a desmineralização da superfície do dente e proliferação bacteriana sobre o tecido lesado, iniciando a instalação da cárie dental (LEITÃO, 2005).

No entanto, é importante ressaltar que o processo cariogênico depende da interação de quatro fatores principais: o hospedeiro (principalmente a saliva e os dentes), a microbiota, o substrato ou dieta e, não menos importante, o tempo (NEWBRUN, 1988).

O processo da lesão cariosa iniciada por *S. mutans* depende de fatores associados como a aderência inicial à superfície dos dentes por meio de glicoproteínas de adesão, a capacidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares insolúveis, por meio de enzimas glucosiltransferases, promovendo o acúmulo e permanência do micro-organismo nas superfícies dos dentes, a alta capacidade para catabolizar carboidratos e produzir ácidos que desmineralizam o esmalte dental e a habilidade para crescer e dar continuidade à metabolização de carboidratos em baixo pH (BURNE, 1998; KURAMITSU, 2003, BANAS, 2004). Assim, a habilidade de *S. mutans* em sintetizar ácidos orgânicos como produto final da glicólise, sobreviver e proliferar em condições de baixo pH e ainda sintetizar grandes quantidades de polissacarídeos extracelulares de adesão são considerados fatores de virulência e desempenham um papel crítico no desenvolvimento de sua cariogenicidade (LOESCHE, 1986)

### **1.3. Manutenção da saúde bucal e enxaguatórios bucais**

Entre os principais mecanismos utilizados para a manutenção da saúde bucal estão a higienização mecânica através da escovação aliada ao uso do fio dental e a utilização de dentífrícios e métodos químicos como coadjuvantes da higienização (MARCOTTE; LAVOIE, 1998, MOREIRA et al., 2009).

Os mecanismos de ação dos agentes químicos utilizados na saúde bucal são diversos, podendo interferir na adesão bacteriana à superfície do dente, prevenir a proliferação microbiana, remover o biofilme pré-existente, ou ainda, alterar a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis, a qual é um mecanismo particularmente importante na aderência bacteriana (RIBEIRO; BUSSADORI, 2000).

A utilização de enxaguatórios bucais vem se consolidando como recurso especialmente importante na higienização oral, principalmente devido a algumas vantagens como fácil utilização, refrescância e palatabilidade e acesso às bactérias mesmo em áreas de maior dificuldade, complementando assim as limitações da higiene oral mecânica (ASADOORIAN, 2006). Vale ressaltar que o benefício adjuvante dos enxaguatórios pode ser particularmente importante para crianças e idosos, usuários geralmente com menor destreza ou impossibilidade de realizar uma escovação adequada.

O controle químico do biofilme dental bacteriano através do uso de enxaguatório bucais se deve à incorporação de substâncias químicas ativas em sua formulação, as quais deveriam inibir o estágio de adesão da colonização bacteriana no biofilme dental, afetando o

crescimento e a atividade metabólica dos micro-organismos do biofilme sem, entretanto, interferir em qualquer outro processo biológico (LEITE, 2009). Além disso, a toxicidade de um enxaguatório deve ser baixa, uma vez que tais soluções podem ser eventualmente ingeridas (GUIMARÃES et al., 2006).

Diversos agentes químicos com propriedades antimicrobianas e anticariogênicas podem ser encontrados em enxaguatório bucais disponíveis no mercado, tais como a clorexidina, o cloreto de cetilpiridíneo e o fluoreto de sódio. Dentre estes, a clorexidina é considerada o “padrão ouro” no controle do biofilme dental (FARDIN et al., 2011). Devido sua natureza catiônica, a clorexidina é rapidamente atraída pela carga negativa da superfície bacteriana e adsorvida à membrana celular por interações eletrostáticas, causando precipitação e coagulação das proteínas citoplasmáticas e consequente morte celular (ZANATTA, RÖSING, 2007). Porém, a utilização da clorexidina por mais de 14 dias está associada a sérios efeitos colaterais como manchas acastanhadas nos dentes, em restaurações ou no dorso da língua, descamação e perda da sensibilidade oral, gosto amargo e a interferência na sensação gustativa (FARDIN et al., 2011).

O cloreto de cetilpiridíneo é um composto de amônio quaternário que se liga facilmente aos tecidos orais e pode interagir com a membrana celular bacteriana, resultando na perda de componentes celulares, perturbação do metabolismo, inibição do crescimento celular e consequente morte bacteriana (ALVES et al., 2012). No entanto, há relatos de que seu uso prolongado está relacionado com surgimento de manchas nos dentes e sensação de ardência (ELEY, 1999). Logo, ressalta-se a necessidade da busca de novos agentes eficazes no controle do biofilme e que possam ser utilizados diária e continuamente.

O fluoreto é uma substância reconhecida mundialmente como agente preventivo da cárie dental, sendo encontrado em diversas formulações de enxaguatórios disponíveis no mercado. Substâncias capazes de inibir a produção de ácidos por micro-organismos bucais podem ter seus efeitos anticariogênicos potencializados na presença de fluoreto (TRAHAN, 1995), uma vez que este interfere físico-quimicamente no desenvolvimento da cárie, reduzindo a desmineralização e aumentando a remineralização do esmalte dental (DAWES; TEN CATE, 1990).

Outras substâncias tradicionalmente utilizadas em enxaguatórios bucais são os componentes dos óleos essenciais como mentol, timol, eucaliptol e salicilato de metila. Segundo a Associação dos Higienistas Dentais do Canadá, a combinação fixa desses derivados de óleos essenciais demonstrou redução de placa e de inflamação gengival

(ASADOORIAN, 2006). Seu uso como enxaguatório bucal foi recomendado pelo *Food and Drug Administration* (FDA, 2003) como agente antiplaca e antigengivite.

#### 1.4. Óleos essenciais

Os óleos essenciais constituem uma mistura de diferentes substâncias lipofílicas, odoríferas e voláteis, formados por células especiais encontradas em folhas, flores, sementes, caules e raízes. São considerados instáveis na presença de ar, luz, calor, umidade e metais.

Os componentes dos óleos essenciais são produzidos pelo metabolismo secundário de plantas e entre as principais classes de substâncias que os compõem estão os monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides. Estes metabólitos secundários são provenientes do metabolismo vegetal da glucose, via dois intermediários principais: o acetato (precursor dos terpenóides, via mevalonato) e o ácido chiquímico (precursor dos fenilpropanóides, originados a partir do ácido cinâmico proveniente dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina) (SIMÕES et al., 2007).

Os terpenóides são produzidos com maior abundância e são considerados os principais constituintes responsáveis pelo aroma e pelas propriedades biológicas das plantas medicinais aromáticas (KALEMBA; KUNICKA, 2003). Outros componentes que também podem ser encontrados nos óleos essenciais são os álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos e ácidos orgânicos (SIMÕES et al., 2007).

A síntese de metabólitos secundários pode ser afetada frequentemente por fatores mecânicos, ambientais, fisiológicos, nutricionais e genéticos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Assim, ainda segundo esses autores, a constituição química dos óleos essenciais pode variar de acordo com fatores como sazonalidade, exposição à luz, disponibilidade hídrica, temperatura, composição atmosférica e do solo, ataque de patógenos e herbívoros, altitude, idade da planta e dia e horário da coleta. Os métodos de extração também podem influenciar diretamente na obtenção dos constituintes químicos, sendo que entre as principais técnicas utilizadas estão a destilação a vapor, a hidrodestilação, a extração por solventes orgânicos, prensagem, enfloração, micro extração de fase sólida e extração com fluido supercrítico (DAWIDOWICZ; RADO; WIANOWSKA, 2008).

Na natureza, os óleos essenciais desempenham importantes funções biológicas conferindo proteção química à planta como antimicrobianos, inseticidas, agentes alelopáticos e contra herbívoros. Também possuem papel relevante na reprodução vegetal, através da atração de insetos polinizadores (MILLEZI, 2012).

Os óleos essenciais têm sido utilizados ao longo da história para uma ampla variedade de aplicações. A civilização egípcia antiga já os incluía em algumas práticas terapêuticas, tratamentos de beleza, na culinária e até mesmo em cerimônias religiosas. Algumas dessas práticas se mantiveram na sociedade moderna e, até hoje, as propriedades dos óleos essenciais são exploradas por setores como a indústria alimentícia, a indústria de fragrâncias, farmacêutica, cosmética e a medicina complementar e alternativa, através da aromaterapia.

Relatos da literatura demonstram que diversos óleos essenciais de diferentes espécies vegetais e alguns de seus componentes isolados possuem ótima atividade antimicrobiana contra uma gama de micro-organismos planctônicos e inclusive sobre biofilmes (REICHLING et al., 2009; KALEMBA; KUNICKA, 2003; NOSTRO et al., 2007; KARPANEN et al., 2008).

O mecanismo de ação dos óleos essenciais e seus compostos contra bactérias ainda não está totalmente compreendido, mas especula-se envolver alterações na membrana plasmática bacteriana através da ação de substâncias lipofílicas, causando comprometimento de sua estrutura e função e coagulação do citoplasma (BAKKALI; AVERBECK, 2008). A ação antibacteriana pode resultar em expansão, aumento da fluidez e permeabilidade da membrana, perturbação de proteínas integrantes da membrana e alteração no transporte de íons, tanto em bactérias gram-positivas quanto gram-negativas (CARSON; MEE; RILEY, 2002).

Na saúde bucal, além de produtos que utilizam mentol, eucaliptol, timol e salicilato de metila, outro exemplo clássico de utilização de derivados de óleos essenciais é o eugenol, usado em associação com o óxido de zinco como cimento provisório para determinados tipos de restaurações odontológicas. Encontrado em óleos essenciais de plantas como o cravo e mirra, esse fenilpropanóide apresenta propriedades bactericidas devido à inibição de enzimas bacterianas através de interações não específicas com proteínas, interrompendo a produção de energia da célula (MASON; WASSERMAN, 1987).

Um estudo realizado com enxaguatórios bucais contendo óleos essenciais indicou que estes foram eficazes na inibição da produção de sulfetos voláteis por bactérias orais, que são as substâncias de odor desagradável responsáveis pela halitose (BRITTO et al., 2009).

Muitos óleos essenciais também estão associados a efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (MIGUEL, 2010), propriedades as quais podem agregar valor terapêutico às formulações.

Assim, a grande vantagem da utilização de óleos essenciais em produtos para saúde bucal, especialmente em enxaguatórios, é a gama de propriedades biológicas e organolépticas que os mesmos podem conferir às formulações, uma vez que podem atuar como agentes

antimicrobianos, inibidores da produção de ácidos e sulfetos voláteis por bactérias orais, antioxidantes, anti-inflamatórios, aromatizantes e flavorizantes simultaneamente. Dessa forma, formulações contendo óleos essenciais podem ser potenciais agentes na prevenção e tratamento das afecções bucais mais comuns como a cárie dental, placa, tártaro, gengivite, periodontite e halitose.

No entanto, apesar de suas muitas aplicações, os óleos essenciais não são isentos de efeitos colaterais e seu uso inadequado pode resultar em reações tóxicas ou alérgicas (LANG; BUCHBAUER, 2012). Logo, estudos adicionais sobre sua segurança devem ser realizados, com o intuito de buscar formulações que sejam efetivas na manutenção da saúde oral e, ainda assim, que possam ser utilizadas com frequência sem apresentar sérios problemas colaterais.

*Objetivos*

## 2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivos:

- 2.1. Obter os óleos essenciais das plantas: *Tithonia diversifolia*, *Aldama arenaria*, *Cymbopogon citratus*, *Illicium verum*, *Zingiber officinale* e *Eucalyptus globulus*, por hidrodestilação;
- 2.2. Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais frente a microorganismos da cavidade bucal;
- 2.3. Avaliar o efeito *in vitro* dos óleos essenciais sobre a produção de ácidos orgânicos por *Streptococcus mutans*;
- 2.4. Selecionar o óleo essencial com propriedades antimicrobiana e anticariogênica mais promissoras;
- 2.5. Determinar o teor e a constituição química do óleo essencial selecionado e avaliar sua citotoxicidade frente a fibroblastos gengivais humanos;
- 2.6. Formular um enxaguatório bucal contendo óleo essencial selecionado e avaliar seu efeito sobre a viabilidade bacteriana e produção de polissacarídeos do biofilme de *Streptococcus mutans*.

## *Material e Métodos*

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Procedimentos fitoquímicos

##### 3.1.1. Material vegetal

As plantas utilizadas neste trabalho foram selecionadas através de um levantamento comparativo dos dados da literatura. Foram escolhidas plantas de fácil obtenção que apresentaram óleos essenciais promissores quanto à atividade antimicrobiana e que até então haviam sido pouco ou não estudadas contra micro-organismos bucais. Assim, as plantas escolhidas foram: *Cymbopogon citratus*, *Illicium verum*, *Zingiber officinale* e *Eucalyptus globulus*, as quais foram adquiridas da empresa Oficina de Ervas Produtos Naturais (CNPJ 08.898.383/0001-79). As espécies *Aldama arenaria* e *Tithonia diversifolia* foram cordialmente fornecidas pelo Prof. Dr. Fernando Batista da Costa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e incluídas no estudo. A planta *Aldama arenaria* foi coletada na rodovia Washington Luiz, S.P., km 223 (S 21° 54'49,3''; W 047° 54'00,5'', altitude 794 m), e a planta *Tithonia diversifolia*, por sua vez, foi coletada em Ribeirão Preto, S.P. (S 21° 10.681'; W 047° 51.541'; altitude 538 m). Na Tabela 1 estão apresentados o nome da espécie vegetal e suas partes utilizadas, a data de coleta e o lote das plantas adquiridas comercialmente.

**Tabela 1.** Espécies vegetais e suas partes utilizadas no estudo, suas datas de coleta e registro dos lotes.

<b>Planta</b>	<b>Parte utilizada</b>	<b>Data da Coleta</b>	<b>Lote</b>
<i>Eucalyptus globulus</i>	folhas	10/10/2011	04SDM
<i>Illicium verum</i>	frutos	12/11/2011	ANIS02/1111
<i>Zingiber officinale</i>	rizomas	12/03/2012	02SDM
<i>Cymbopogon citratus</i>	folhas	02/04/2012	25SDM
<i>Aldama arenaria</i>	folhas e inflorescências	24/02/2012	--
<i>Tithonia diversifolia</i>	folhas e inflorescências	25/05/2012	--

##### 3.1.2. Extração dos óleos essenciais

As frações de componentes voláteis das plantas foram obtidas por hidrodestilação em aparelho Clevenger modificado, seguindo os parâmetros da Farmacopéia Brasileira IV edição (1996-2004). Os materiais vegetais provenientes da empresa Oficina de Ervas foram adquiridos secos e triturados. No laudo de controle de qualidade consta a informação de que a secagem foi feita à sombra. Das espécies coletadas, por sua vez, foram utilizadas as folhas e

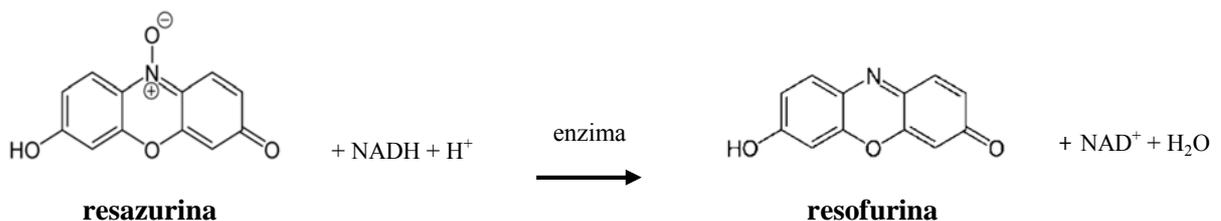
inflorescências frescas, as quais foram previamente trituradas em liquidificador com água destilada, antes do processo de extração.

O material vegetal foi pesado e acondicionado em balão de fundo redondo de volume apropriado, contendo água destilada até a metade do volume do balão. Após 4 h de destilação, os óleos essenciais foram coletados com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro, transferidos para recipientes adequados, protegidos da luz e armazenados em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Os rendimentos das extrações foram calculados a partir do peso do material vegetal utilizado e expressos em porcentagem em massa.

### 3.2. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais

Para avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi utilizado o método de microdiluição em microplaca segundo a metodologia preconizada pelo “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI, 2006), com adaptações, empregando a resazurina como revelador do crescimento bacteriano. A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) é um composto não fluorescente e apresenta coloração azulada intensa, porém, quando na presença de células viáveis, é reduzida à resofurina, a qual emite fluorescência e apresenta coloração rosa (RAMBERSAD, 2012). A manutenção da cor original indica que não houve redução da resazurina pelas desidrogenases celulares, indicando um possível comprometimento do metabolismo celular. Assim, a resazurina pode ser utilizada como revelador do crescimento bacteriano através da mudança de coloração, a qual pode ser detectada qualitativamente a olho nu.

O esquema da reação de redução da resazurina está representado na Figura 1.



**Figura 1.** Reação de oxirredução da resazurina

#### 3.2.1. Micro-organismos utilizados

Foram utilizados neste trabalho micro-organismos provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC), indicados na Tabela 2 (página 15).

**Tabela 2.** Espécies de micro-organismos utilizados nos ensaios de atividade antimicrobiana e suas características.

Micro-organismo	Padrão ATCC	Características
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175	coco, gram positivo, microaerófilo
<i>Streptococcus mitis</i>	ATCC 49456	coco, gram positivo, microaerófilo
<i>Streptococcus sanguis</i>	ATCC 10556	coco, gram positivo, microaerófilo
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC 25975	coco, gram positivo, aerófilo
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 4082	coco, gram positivo, aerófilo
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 11578	bacilo, gram positivo, microaerófilo

### 3.2.2. Preparo do inóculo

As linhagens armazenadas em solução de glicerol 15% em caldo triptona de soja (TSB, BD) foram retiradas do freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  e rapidamente descongeladas em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$ . As suspensões bacterianas foram transferidas para tubos contendo caldo TSB e posteriormente incubadas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 h, em atmosferas adequadas (*S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguis* e *L. casei* foram incubados em jarras de microaerofilia, enquanto *S. salivarius* e *E. faecalis* foram mantidos em atmosfera de aerobiose).

Após este período, as bactérias foram inoculadas em ágar sangue e armazenadas em estufa durante mais 24 h, a  $37^{\circ}\text{C}$ , em atmosferas adequadas. Após o crescimento, as colônias foram transferidas com auxílio de uma alça esterilizada para tubos contendo solução salina 0,9% para o preparo do inóculo, o qual foi ajustado a uma concentração de  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de colônia (UFC)/mL, a partir de uma suspensão 0,5 McFarland padronizada em espectrofotômetro (Biospectro, modelo SP-220) a 625 nm.

### 3.2.3. Preparo das amostras e do antimicrobiano padrão

Para o preparo das amostras, 3 mg dos óleos essenciais foram pesados com auxílio de uma balança analítica digital (Shimadzu, modelo AY220) e solubilizados em 75  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck). Após a completa solubilização, foram adicionados 525  $\mu\text{L}$  de caldo TSB. O antimicrobiano dicloridrato de clorexidina (CHX, Sigma) foi utilizado como controle positivo para a inibição do crescimento bacteriano. Foi preparada uma solução 0,1 mg/mL do antimicrobiano em água destilada esterilizada, a qual foi posteriormente diluída em caldo TSB para obtenção de uma concentração de 0,02 mg/mL.

### 3.2.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Em microplacas de 96 poços foram adicionados o meio de cultura TSB, as soluções das amostras e do antimicrobiano padrão e a suspensão padronizada do inóculo, totalizando um volume final de 100 µL. Os óleos essenciais foram avaliados na faixa de concentrações de 0,97 a 2.000 µg/mL, enquanto o antimicrobiano padrão dicloridrato de clorexidina foi avaliado na faixa de 0,01 a 5,9 µg/mL. Para todas as bactérias testadas foi realizado o controle do solvente com a concentração máxima de DMSO utilizada para solubilização das amostras (5% v/v). Foram realizados os controles de crescimento das culturas, bem como os controles apropriados de esterilidade do caldo, dos óleos essenciais e do dicloridrato de clorexidina. As placas foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por 24 h, respeitando-se as exigências de atmosfera de cada bactéria utilizada.

Após o período de incubação, foram adicionados 30 µL de solução aquosa de resazurina 0,02% (Sigma) em cada poço. A leitura dos resultados foi realizada visualmente e a CIM foi definida como a menor concentração de amostra na qual não ocorreu mudança de coloração azul (sem crescimento bacteriano) para rosa (crescimento bacteriano).

### 3.2.5. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para determinação dos valores de CBM, o conteúdo de cada poço das microplacas do ensaio da CIM foi inoculado em placa contendo ágar sangue, com auxílio de um palito de madeira esterilizado. As placas foram incubadas a 37°C, por 24 h, em estufa bacteriológica em atmosfera adequada. Os valores de CBM foram determinados como sendo a menor concentração na qual não houve crescimento bacteriano visível no ágar sangue.

## 3.3. Efeito dos óleos essenciais sobre o potencial acidogênico de *S. mutans in vitro* e determinação das curvas dose-efeito

*S. mutans* é considerado um dos micro-organismos mais cariogênicos do biofilme dental, devido sua habilidade em produzir ácidos a partir de carboidratos fermentáveis provenientes da dieta e continuar crescendo e metabolizando carboidratos em baixo pH (CCAHUANA-VASQUEZ; CURY, 2010). Assim, os efeitos dos óleos essenciais sobre a produção de ácidos orgânicos por este micro-organismo foram avaliados através de ensaio glicolítico padronizado (LEITÃO et al., 2004).

Alíquotas de 10 mg de *S. mutans* ATCC 25175 armazenadas em solução aquosa de glicerol 20% (p/v), a -80 °C, foram descongeladas em banho-maria a 37°C, por 5 min. Posteriormente, foram centrifugadas (12.000 g, 2 min, temperatura ambiente) e o

sobrenadante descartado. O *pellet* de células foi cuidadosamente ressuspenso em tampão fosfato de potássio 6 mmol/L, pH 6.9 (NaCl 0,865 g/L, KCl 0,625 g/L, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,125 g/L, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,072 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,326 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,803 g/L), suplementado com glucose (Fluka) 10 mmol/L como substrato. A cada suspensão bacteriana foram adicionados os óleos essenciais na faixa de concentrações de 10 a 500 µg/mL, dissolvidos em DMSO (Merck). As suspensões bacterianas foram incubadas em banho-maria a 37°C e a elas foi introduzido um eletrodo de bulbo fino (modelo 8103, Ross, Orion) para leitura de pH. O potenciômetro, modelo 710A (Orion) conectado a uma porta serial de impressora modelo Epson LX - 300 foi programado para monitorar o pH das amostras durante 30 min, com intervalos de 1 min entre os registros. A metabolização de glucose pelos estreptococos com consequente produção de compostos ácidos provocou uma queda do pH do meio de suspensão, em função do tempo de incubação. O controle positivo, onde a síntese de ácidos orgânicos foi completamente inibida, consistiu em uma suspensão de células bacterianas tratadas com solução tampão contendo digluconato de clorexidina (Sigma) 0,12% (v/v). O controle negativo consistiu em uma suspensão tratada com solução tampão contendo DMSO 5% (v/v), concentração máxima utilizada para solubilizar os óleos essenciais e a qual não interferiu na produção bacteriana de ácidos.

Os valores de área integrada (AI) obtidos com as curvas de pH *versus* tempo foram utilizados como parâmetro para determinação da porcentagem de inibição produzida pelas diluições dos óleos essenciais sobre o potencial acidogênico bacteriano. O valor de AI do controle negativo foi subtraído dos valores de AI referentes à curva do controle positivo e às curvas de pH obtidas com as suspensões bacterianas tratadas com as diluições dos óleos. O novo valor de área integrada, obtido para o controle positivo, foi considerado equivalente a 100% de inibição e, a partir deste valor, calculou-se o percentual de inibição do potencial acidogênico produzido pelo tratamento com as amostras, segundo a relação:

$$\% I = (AI_A / AI_{CP}) \times 100\% \quad (\text{Equação I})$$

Onde:

% I = percentual de inibição do potencial acidogênico bacteriano;

AI<sub>A</sub> = área integrada da curva da amostra;

AI<sub>CP</sub> = área integrada da curva do controle positivo.

As concentrações responsáveis por 50% da inibição do potencial acidogênico bacteriano (CI<sub>50</sub>) foram calculadas a partir das curvas dose-efeito. Os resultados foram obtidos em triplicata e comparados por análise de variância (ANOVA), seguida por teste de Dunnett (p<0,05).

### 3.4. Seleção do óleo essencial

A seleção do óleo essencial mais promissor em relação à atividade anticariogênica se deu através da análise e comparação dos resultados obtidos nos ensaios de atividade antimicrobiana e de inibição do potencial acidogênico de *S. mutans*. O óleo que apresentou menores concentrações capazes de inibir o crescimento e a produção de ácidos bacterianos *in vitro* foi escolhido para realização das etapas subsequentes do trabalho.

### 3.5. Análise fitoquímica do óleo essencial selecionado

A análise da composição química do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, através de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Foi utilizado equipamento Shimadzu, modelo CG/EM QP-2010, equipado com fonte de ionização por elétrons (IE) e analisador do tipo quadrupolar. A separação cromatográfica foi realizada em coluna DB-5MS (30mx 0.25mm x 0.25um, Phenomenex), com temperatura do injetor a 250°C e hidrogênio como fase móvel (fluxo de gás: 1,3 mL.min<sup>-1</sup>). A temperatura da coluna foi mantida inicialmente a 60°C por 1 min, aumentando para 240°C em 10 minutos, permanecendo nesta temperatura por 60 min.

Após eluição, as amostras foram direcionadas pelo divisor de fluxo para a fonte de ionização, na razão de 1:20. A temperatura da fonte foi ajustada em 250°C e a energia do feixe de elétrons foi de 70 eV. O analisador foi controlado para separar íons de *m/z* entre 40 e 400. Uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos saturados (C9-C25) foi também adicionada ao óleo essencial antes da injeção no cromatógrafo, sendo analisada nas mesmas condições, a fim de determinar o índice de Kovats (IK) dos constituintes (ADAMS, 1995). O IK experimental foi calculado de acordo com a equação II, proposta por Dool e Kratz (1963):

$$IK = 100n [(t_x - t_{n-1}) / (t_n - t_{n-1})] + 100 \times C_{n-1} \quad (\text{Equação II})$$

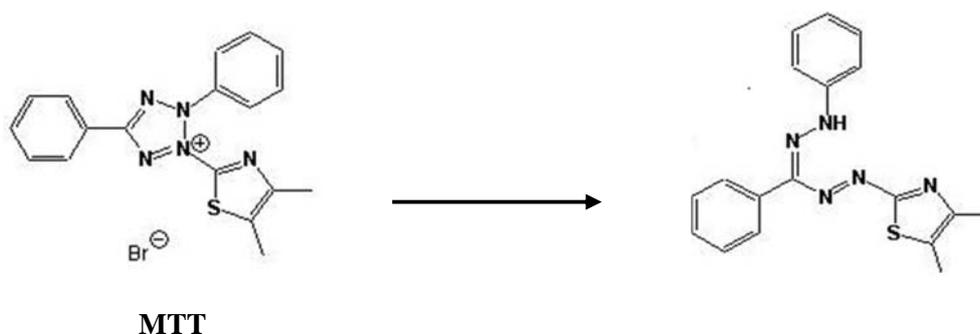
Nesta equação, “ $t_x$ ” representa o tempo de retenção da amostra, “ $t_n$ ” o tempo de retenção do hidrocarboneto imediatamente superior em relação ao tempo de retenção da amostra, “ $t_{n-1}$ ” o tempo de retenção do hidrocarboneto imediatamente inferior em relação ao tempo de retenção da amostra e “ $n$ ” é dado por  $C_n - C_{n-1}$ , sendo  $C_n$  o número de carbonos do alcano correspondente ao tempo de retenção “ $t_n$ ” e “ $C_{n-1}$ ” o número de carbonos do alcano correspondente ao tempo de retenção “ $t_{n-1}$ ”.

A determinação dos componentes foi obtida através da comparação dos valores de IK experimentais com os valores da literatura, além da comparação dos espectros de massas dos constituintes com os espectros de massas das bibliotecas Wiley 7, FFNSC 1.3 (*Flavour & Fragrance Natural & Synthetic Compounds*) e NIST 08 (*National Institute of Standards and Technology*), que forneceu o índice de similaridade (IS) expresso em porcentagem.

Os compostos cujos picos apresentaram IS abaixo de 85% e IK experimentais com diferença maior que 20 em relação à literatura foram considerados como “não identificados”.

### 3.6. Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial selecionado

A atividade citotóxica *in vitro* do óleo essencial selecionado foi avaliada através do ensaio colorimétrico do sal de tetrazolium MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium] (TWENTYMAN; LUSCOMBE, 1987). O MTT é um composto amarelo solúvel em água que pode ser convertido pelas enzimas oxirredutases dependentes de NAD(P)H das células viáveis, originando o sal de formazan azul, que é insolúvel em água. Assim, a quantidade de formazan formada é proporcional ao número de células viáveis e pode ser indicativa da proliferação celular. A reação de oxirredução do MTT está apresentada na Figura 2.



**Figura 2.** Reação de conversão do MTT em sal de formazan

### 3.6.1. Cultura de células e condições de cultivo

Fibroblastos gengivais humanos (FGH) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro foram utilizados nos ensaios de citotoxicidade.

As células foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido, em uma solução de soro bovino fetal (Gibco) e 10% de DMSO (Merck). Para início do cultivo dessa linhagem celular, foi realizado um rápido descongelamento em banho-maria a 37°C e as células foram transferidas para tubos estéreis contendo meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 100 UI/mL de penicilina G, 100 mg/mL de estreptomicina e 1 µg/mL de anfotericina (Sigma). Após centrifugação (2.000 g, 5 min, 4°C), o sobrenadante foi removido e o precipitado ressuspenso em garrafas de cultura contendo DMEM. A suspensão celular foi mantida em incubadora (Forma Scientific, Series II) a 37°C, em fluxo de 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico. Para expansão da cultura celular, foram realizados sucessivos subcultivos (repiques), após obtenção de aproximadamente 90% da confluência celular. Para tal, uma solução de tripsina/EDTA (Sigma) 0,05% em tampão fosfato de sódio e potássio, pH 7,2, agiu durante 3 min sobre as células, a fim de dispersar a monocamada celular. Os fibroblastos aderentes foram destacados da parede das garrafas em consequência da ação proteolítica da enzima. Assim, após a centrifugação dessa suspensão de células (2.000 g, 5 min, 4°C), o *pellet* celular foi redistribuído para novas garrafas de cultura, possibilitando sua proliferação e expansão.

### 3.6.2. Realização da técnica

Aproximadamente  $1,5 \times 10^4$  FGH por poço foram incubados em microplacas de 96 poços na ausência ou presença do óleo essencial selecionado (concentrações finais na faixa de 31,25 a 2.000 µg/mL), preparados em DMSO (Merck) e DMEM sem vermelho de fenol (LGC Biotecnologia). O controle negativo para citotoxicidade consistiu em células tratadas apenas com o meio de cultura, enquanto o controle positivo consistiu em células tratadas com solução aquosa de dodecil sulfato de sódio 20% (Riedel-de Haën). Os controles do solvente DMSO e do antimicrobiano digluconato de clorexidina também foram realizados, nas concentrações de 1 e 0,12% no meio de cultura, respectivamente (v/v). Após 30 min de exposição às amostras, 200 µL de solução de MTT (Sigma) 0,5% em tampão fosfato de sódio e potássio, pH 7,4, foram adicionados a cada poço. As placas foram protegidas da ação da luz e incubadas durante 3 h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, a mistura foi removida cuidadosamente,

sem perturbar as células aderidas e 200 µl de DMSO foram adicionados para solubilizar o sal de formazan produzido pelas células viáveis. Os valores de absorvância foram registrados através de aparelho espectrofotômetro de microplacas (Cary 50, Varian), em comprimento de onda 570 nm. Os resultados foram obtidos em triplicata e comparados através de análise de variância (ANOVA), seguida por teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

### **3.7. Preparo e caracterização do enxaguatório bucal contendo óleo essencial selecionado**

O enxaguatório bucal foi formulado e caracterizado físico-quimicamente com a colaboração do Prof. Dr. Mateus Freire Leite do Núcleo de Tecnologia em Saúde da Universidade Federal da Bahia.

#### **3.7.1. Preparo da microemulsão**

O termo microemulsão é utilizado para designar sistemas estáveis de fases microeterogêneas, que podem apresentar de três a cinco constituintes, tais como: a) tensoativo, água e fase óleo; b) tensoativo, cotensoativo, água e fase óleo; c) mistura de dois tensoativos, cotensoativo, água e fase óleo (ROSSI et al. 2007). O enxaguatório bucal foi desenvolvido a partir da construção de um diagrama de fases pseudo-ternário obtido de maneira tradicional por titulação lenta de uma mistura de óleo/tensoativos/cotensoativo com uma fase aquosa, à temperatura ambiente. O diagrama apontou as proporções dos seguintes componentes para obtenção de uma microemulsão: fase oleosa composta por óleo de canola, a fase aquosa composta por água e a mistura de tensoativos e cotensoativo composta por PEG 40 (óleo de rícino hidrogenado e etoxilado), sorbitol e glicerol (Synth) na proporção de 1:1:1 (LEITE et al., 2008). A mistura óleo/tensoativos/cotensoativo foi titulada com água purificada, agitada continuamente e as regiões de formação de microemulsão foram identificadas como translúcidas, de baixa viscosidade e isotrópicas.

#### **3.7.2. Caracterização físico-química da microemulsão**

Algumas propriedades físico-químicas do enxaguatório bucal obtido pelo diagrama de fases foram analisadas, a fim de investigar se a formulação apresentava características de um sistema microemulsionado proposto.

##### *3.7.2.1. Microscopia de luz polarizada*

A formulação foi colocada sobre lâmina de vidro coberta com lamínula e posteriormente observada em microscópio de luz polarizada (Olympus BX – 50). Foi examinada se a amostra

apresentou transparência (possível microemulsão) ou formação de regiões aparentemente translúcidas.

#### 3.7.2.2. Tamanho das gotículas

O tamanho de gotículas da formulação foi determinado com o auxílio de um *Light Scattering* modelo Zetasizer Nano ZS – ZEN3601 (Malvern Instruments), à temperatura ambiente, em ângulo de 173°.

#### 3.7.2.3. Índice de refração

O índice de refração do enxaguatório bucal foi determinado através de refratômetro analógico (ABBE 2 Waj), por adição de uma alíquota de 50µL da amostra na câmara do mesmo, seguido de leitura manual, como método auxiliar para determinação do tamanho de gotículas.

#### 3.7.2.4. Potencial Zeta

O valor de potencial zeta da formulação foi determinado com o auxílio de um *Zetasizer Nano ZS – ZEN3601* (Malvern Instruments), com a finalidade de avaliar a estabilidade do sistema proposto, associado à análise do tamanho de gotículas.

#### 3.7.2.5. Condutividade

A condutividade (em µS/cm) da formulação foi determinada à temperatura ambiente com o auxílio de um condutivímetro modelo MCA 150 (Tecnopom), a fim de se predizer se o sistema isotrópico em estudo apresentava água ou óleo na fase externa.

#### 3.7.2.6. Densidade

A densidade, relação entre massa e volume, foi determinada pela densidade relativa utilizando água purificada como substância padrão, à temperatura de 20°C, pelo método tradicional do picnômetro (Farmacopéia Brasileira, 1988; Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos/ANVISA, 2004). A densidade da amostra foi calculada através da equação III:

$$d = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0) \quad (\text{Equação III})$$

Onde:

d = densidade;

m<sub>0</sub> = massa do picnômetro vazio;

m<sub>1</sub> = massa do picnômetro com água purificada a 20°C;

m<sub>2</sub> = massa do picnômetro com a amostra a 20°C.

### 3.7.2.7. Reologia

Para determinação do comportamento reológico do enxaguatório bucal, foi utilizado um Reômetro Brookfield, modelo DV-III LV, com adaptador de pequenas amostras, acoplado a um computador com *Software Rheocalc V1.1 Brookfield Engineering Laboratories* com a utilização de *spindle* SC4-18 e 8 mL de amostra, à 25 °C. As medições foram realizadas em velocidades progressivamente maiores (de 1 até 170 rpm) para a obtenção da curva ascendente e em velocidades progressivamente menores (de 170 a 1 rpm), no retorno, para obtenção da curva descendente.

### 3.7.2.8. pH

O valor de pH da microemulsão foi determinado por um peagâmetro (Digimed, modelo DMPH-2).

### 3.7.2.9. Centrifugação

O enxaguatório bucal foi centrifugado imediatamente após o preparo a 956 g por 30 min, à temperatura ambiente, a fim de se determinar sua estabilidade como um sistema isotrópico de fase única (Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos/ANVISA, 2004).

## 3.8. Avaliação da dispersão do óleo essencial no enxaguatório bucal

A fim de analisar se o óleo essencial veiculado estava homogeneamente disperso no sistema da microemulsão, foram realizados dois procedimentos de extração do óleo a partir da formulação.

### 3.8.1. Fracionamento do enxaguatório bucal contendo óleo essencial por partição líquido-líquido

Em um funil de separação foram adicionados 10 mL da formulação contendo 1 mg/mL de óleo essencial, seguido da adição de 5 mL de n-hexano (Sigma). O conteúdo do funil foi cuidadosamente agitado para evitar a formação de emulsão, e após 5 min separou-se a fase orgânica da fase aquosa. A fase aquosa foi submetida a processo de partição nas mesmas condições por mais duas vezes. Em seguida, a um Erlenmeyer contendo as fases orgânicas reunidas foi adicionado sulfato de sódio anidro (Synth) para remoção da água e o conteúdo foi posteriormente filtrado. A fase orgânica foi submetida à evaporação em aparelho evaporador rotativo à vácuo (Fisatom). O remanescente no balão, após a total evaporação do solvente, foi solubilizado com 5 mL de acetato de etila (Chemco) e transferido para frasco previamente pesado. O frasco foi mantido aberto até a evaporação total do solvente.

A fase aquosa proveniente do primeiro processo de partição foi submetida a outro processo de partição líquido-líquido, mas agora com acetato de etila (Chemco) por três vezes consecutivas.

Os mesmos procedimentos foram repetidos com uma formulação idêntica ao enxaguatório bucal, porém sem o óleo essencial veiculado.

### **3.8.2. Hidrodestilação do enxaguatório bucal contendo óleo essencial**

Os componentes voláteis da formulação foram obtidos através de hidrodestilação em aparelho Clevenger modificado. Em um balão de fundo redondo foram acondicionados 10 mL da microemulsão contendo 1 mg/mL de óleo essencial e seu volume foi completado para 100 mL com água destilada. Após a destilação e evaporação dos componentes voláteis, foram coletados os primeiros 60 mL que condensaram no aparelho Clevenger. A mistura coletada foi submetida a processo de partição líquido-líquido com 20 mL de n-hexano (Sigma) e a fase orgânica foi transferida a um frasco apropriado, o qual foi mantido aberto até a evaporação total do solvente.

### **3.8.3. Análise fitoquímica das frações obtidas por partição líquido-líquido e hidrodestilação do enxaguatório bucal contendo óleo essencial**

A amostra coletada da hidrodestilação do enxaguatório bucal, bem como suas frações hexânica e acetato de etila obtidas por partição, foram submetidas à análise por CG-EM. As análises foram realizadas sob as mesmas condições cromatográficas descritas na seção 3.5.

## **3.9. Avaliação da atividade antimicrobiana do enxaguatório bucal contendo o óleo essencial selecionado e das frações obtidas da formulação por partição líquido-líquido**

A atividade antimicrobiana da microemulsão e de suas frações hexânica e acetato de etila foram avaliadas frente a *S. mutans*, considerado um dos micro-organismos mais cariogênicos do biofilme dental.

A microemulsão e suas frações foram diluídas em caldo TSB (BD) e concentrações na faixa de 0,78 a 400 µg/mL foram testadas. O controle positivo consistiu em soluções aquosas de dicloridrato de clorexidina (Sigma), na faixa de concentrações de 0,01 a 5,9 µg/mL. A determinação da CIM e CBM das amostras foi realizada através da metodologia descrita na seção 3.2.

### **3.10. Determinação do tempo de morte celular em culturas de *S. mutans* tratadas com o enxaguatório bucal contendo óleo essencial selecionado**

O ensaio para determinação do tempo de morte celular foi realizado com um inóculo final de *S. mutans* equivalente a  $5 \times 10^5$  UFC/mL, padronizado segundo a metodologia descrita na seção 3.2.2. O enxaguatório bucal contendo 1 mg/mL do óleo essencial selecionado foi diluído em caldo TSB para obtenção de uma concentração correspondente a 400 µg/mL de óleo. O enxaguatório Periogard<sup>®</sup>, com princípio ativo digluconato de clorexidina 0,12%, também foi testado na mesma diluição. O óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* foi testado em sua concentração bactericida mínima para *S. mutans*. O controle negativo foi tratado somente com solução salina 0,9%.

As amostras foram adicionadas a uma microplaca de cultura contendo meio TSB e o inóculo padronizado, sendo posteriormente incubadas a 37°C por 24 h. No tempo zero de incubação, bem como após 10 min, 30 min e 24 h, alíquotas de 100 µL de cada amostra foram coletadas e diluições centesimais seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  foram realizadas em solução salina 0,9%. Uma alíquota de 20 µL das amostras diluídas e não diluídas foram semeadas em placas contendo ágar sangue, com o auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada. A contagem de UFC foi feita após 24 ou 48 h de incubação em jarras de microaerofilia.

Foram construídas curvas de  $\log_{10}\text{UFC}_x\text{mL}^{-1}$  pelo tempo de incubação. Considerou-se como tempo de morte celular o período de incubação necessário para reduzir em 99,9% a população bacteriana do inóculo original.

### **3.11. Avaliação da citotoxicidade do enxaguatório bucal contendo óleo essencial selecionado**

Os efeitos da microemulsão sobre a proliferação de fibroblastos gengivais humanos foram avaliados de acordo com metodologia descrita na seção 3.6. O enxaguatório bucal foi avaliado em diluições de 4 a 80 vezes em meio de cultura DMEM. Também foram avaliados os efeitos citotóxicos das mesmas diluições do enxaguatório referência Periogard<sup>®</sup>, da Colgate.

### **3.12. Efeito da formulação de enxaguatório bucal contendo óleo essencial selecionado sobre a formação do biofilme de *S. mutans***

Os experimentos do biofilme foram realizados com a colaboração da Profª. Dra. Carolina Patrícia Aires do Laboratório de Bioquímica da FCFRP-USP.

Biofilmes de *S. mutans* UA 159 simulando as condições fisiológicas de formação e exposição de biofilme que ocorrem na cavidade oral foram formados sobre esmalte dental bovino para a avaliação dos efeitos do enxaguatório bucal sobre micro-organismos não planctônicos.

### 3.12.1. Preparo dos blocos dentais

Para este estudo foram utilizados incisivos centrais bovinos hígidos. Os dentes foram armazenados em formol por um período mínimo de 30 dias (AIRES et al., 2002). Para a confecção dos blocos dentais, foi utilizado um disco de corte (Carborundum Abrasivos) para retirada da raiz do dente. Posteriormente, os blocos de esmalte bovino foram desgastados com o auxílio de um motor de chicote (Beltec), acoplado a uma broca drila, até atingirem as dimensões 1,2 x 0,8 cm ( $\pm$  0,1 cm). Antes da utilização no ensaio, os blocos dentais foram imersos em solução aquosa contendo P<sub>i</sub> (fosfato inorgânico) 0,06 mmol/L e Ca<sup>++</sup> 0,08 mmol/L e autoclavados a 121°C, durante 15 min (CCAHUANA-VASQUEZ; CURY, 2010).

### 3.12.2. Preparo do biofilme

Os biofilmes simularam os episódios de “miséria-fartura” que ocorrem na cavidade oral (CCAHUANA-VASQUEZ; CURY, 2010). Assim, cepas de *S. mutans* UA 159 mantidas em freezer a -80°C foram rapidamente descongeladas em banho-maria a 37°C e transferidas para meio de cultura ultrapurificado LMW (*Low Molecular Weight*), contendo triptona 2,5% (p/v) (BD), extrato de levedura 1,5% (p/v) (BD), suplementado com 1% de glucose (p/v) (Merck). As culturas foram mantidas em estufa (Sanyo, MCO-19AIC) a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> para reativação. Após 18 h, realizou-se a semeadura bacteriana em placas contendo ágar BHI (*Brain Heart Infusion*, BD), que foram mantidas em estufa sob as mesmas condições por mais 24 h. As colônias formadas foram transferidas com auxílio de alça esterilizada para tubos contendo meio de cultura LMW suplementado com 1% de glucose, para a formação do inóculo. Após 18 h de incubação, 110 µL deste inóculo foram transferidos para 50 mL de meio LMW contendo glucose 0,1 mmol/L (para simular as condições da saliva). Foram transferidos 2,5 mL desta mistura para cada poço de uma placa de cultura de 24 poços. Imediatamente, os blocos de esmalte foram ancorados por suportes metálicos na placa de cultura e o conjunto incubado a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, de forma que os micro-organismos não fossem perturbados e pudessem aderir ao espécime.

Após 24 h, os blocos foram transferidos para novo meio LMW contendo glucose 0,1 mmol/L e posteriormente expostos à sacarose 10% (Merck), durante 1 min, 8x/dia

(CCAHUANA-VASQUEZ; CURY, 2010). O meio de cultura foi trocado diariamente das placas e o pH de cada poço foi monitorado através de um peagâmetro (Jenway, modelo 3510 pHmeter). No segundo dia de crescimento, os biofilmes (n=3) foram divididos em grupos e tratados por 1 min, 2x/dia, por mais 3 dias, com uma das seguintes soluções: 1) NaCl 0,9% (controle positivo de crescimento); 2) digluconato de clorexidina 0,12% (controle negativo de crescimento); 3) óleo essencial selecionado 250 µg/mL; 4) óleo essencial selecionado 1.000 µg/mL. O controle de contaminação foi realizado ao início de cada dia de tratamento através da técnica de coloração Gram, a fim de se verificar a presença exclusiva de cocos gram-positivos no meio de cultura. Após o último dia de crescimento do biofilme de *S. mutans*, os blocos dentais foram retirados do suporte metálico com o auxílio de pinças esterilizadas e transferidos para tubos contendo 7 mL de solução salina 0,9%. Estas amostras foram homogeneizadas através de um sonicador (Fischer Scientific, modelo CL-3340) e a avaliação microbiológica e extração de polissacarídeos foram efetuadas. (AIRES et al., 2008).

### 3.12.3. Viabilidade bacteriana do biofilme

Os biofilmes foram sonicados com 3 pulsos de amplitude 20% por 15 s, a fim de homogeneizar as amostras (AIRES et al., 2008). Uma alíquota de 100 µL da suspensão sonicada dos biofilmes tratados foi diluída em 900 µL de NaCl 0,9% e diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  foram inoculadas em duplicata pela técnica da gota em ágar BHI, para contagem de micro-organismos (WESTERGREN; KRASSE, 1978). As placas foram incubadas em estufa de 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 24 h. As UFC foram contadas em lupa estereoscópica e os resultados expressos em UFC/mL de biofilme dental.

### 3.12.4. Extração de polissacarídeos

Polissacarídeos são considerados fatores de virulência bacterianos (HAMADA; KOGA; OOSHIMA, 1984) e por isto foram extraídos e determinados neste estudo. Para sua extração, 400 µL da suspensão sonicada foi centrifugada a 20.817 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido a um tubo denominado PECs (polissacarídeos extracelulares solúveis) e o precipitado lavado com solução salina 0,9% e centrifugado novamente. O sobrenadante foi adicionado ao tubo PECs e ao precipitado foram adicionados 400 µL de NaOH 1 mol/L (Merck). Após agitação mecânica durante 15 min e posterior centrifugação (20.817 g, 10 min, 4°C), o sobrenadante foi transferido a um tubo denominado PECi (polissacarídeos extracelulares insolúveis). O precipitado foi ressuscitado em 400 µL de NaOH 1 mol/L e incubado em banho-maria a 100°C por 15 min. Após o período de incubação, a amostra foi

centrifugada novamente (20.817 g, 10 min, 4°C). O sobrenadante foi transferido a um tubo denominado PIC (polissacarídeos intracelulares) e o precipitado descartado. Os polissacarídeos PECs, PECi e PIC foram precipitados com etanol (Merck) e incubados por 30 min, a -20° C. Em seguida, os tubos foram centrifugados, os precipitados lavados duas vezes com etanol gelado 75% (Merck) e o sobrenadante descartado.

### 3.12.5. Determinação de polissacarídeos

Antes da determinação de carboidratos, as amostras de polissacarídeos foram secas à temperatura ambiente. Os precipitados foram ressuspensos em 510 µL de NaOH 1 mol/L e os carboidratos totais foram estimados pelo método fenol sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), utilizando glucose como padrão.

### 3.13. Aplicação de método estatístico multivariado aos dados químicos (OPLS-DA)

Este estudo foi realizado com o intuito de prever quais os possíveis componentes químicos responsáveis pela atividade antimicrobiana encontrada para o óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria*.

Assim, os dados obtidos na avaliação da atividade antimicrobiana e os perfis químicos dos óleos essenciais das folhas *C. citratus*, *E. globulus* e *A. arenaria*, dos rizomas de *Z. officinale* e das inflorescências coletadas em fevereiro de 2012, fevereiro de 2013, março de 2013 e fevereiro de 2014 de *A. arenaria*, obtidos por CG-EM, foram organizados em uma planilha no programa Microsoft® Excel 2010 (*Microsoft Corporation*), totalizando 489 substâncias. Esses dados foram correlacionados por meio de análise supervisionada denominada *Orthogonal Partial Least Squares - Discriminant Analysis* (OPLS-DA™; SIMCA, Umetrics, Suécia). Assim, todos os picos obtidos para todos os cromatogramas, inclusive os picos não identificados, foram considerados como a matriz X, a qual foi correlacionada com uma matriz resposta (atividade antimicrobiana) através do *software* SIMCA.

Para a predição, foram classificados como ativos óleos essenciais com atividade abaixo de 100 µg/mL, moderadamente ativos os óleos com atividade entre 100 e 400 µg/mL, fracamente ativos os óleos com atividades entre 500 e 1.000 µg/mL e inativos óleos com atividade acima de 1.000 µg/mL (GIBBONS, 2004; RIOS; RECIO, 2005; SALEEM et al., 2010).

### **3.14. Análise estatística**

Variações inter-grupo de diferentes parâmetros foram estimadas por análise de variância (ANOVA) e testes estatísticos adequados. Tratamentos qualitativos foram comparados usando o teste de Dunnet, com intervalo de confiança de 95% e nível de significância 5%. Os cálculos estatísticos, bem como as representações gráficas, foram elaborados pelo programa GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 5.01 (*Graphpad Software*) e cálculos adicionais foram realizados com o auxílio do programa Microsoft<sup>®</sup> Excel 2010 (*Microsoft Corporation*). A análise estatística multivariada foi realizada com o auxílio do programa SIMCA (Umetrics, Suécia).

*Resultados*

## 4. Resultados

### 4.1. Obtenção dos óleos essenciais

Os materiais vegetais foram previamente pesados e submetidos à hidrodestilação durante 4 h. Os rendimentos da obtenção dos componentes voláteis das diferentes plantas estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Espécies vegetais utilizadas, suas massas, massas dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação e rendimento em porcentagem (% m/m) do processo de extração.

Espécie vegetal	Massa vegetal (g)	Massa OE (g)	Rendimento (%)
<i>Illicium verum</i> <sup>a</sup>	100,00	5,33	5,33
<i>Eucalyptus globulus</i> <sup>a</sup>	100,00	3,56	3,56
<i>Cymbopogon citratus</i> <sup>a</sup>	100,00	1,30	1,30
<i>Zingiber officinale</i> <sup>a</sup>	100,00	1,03	1,03
<i>Aldama arenaria</i> (folhas) <sup>b</sup>	20,99	0,28	0,93
<i>Tithonia diversifolia</i> (folhas) <sup>b</sup>	500,00	1,35	0,27
<i>Tithonia diversifolia</i> (inflorescências) <sup>b</sup>	500,00	0,40	0,08
<i>Aldama arenaria</i> (inflorescências) <sup>a</sup>	311,33	0,23	0,08
<i>Aldama arenaria</i> (inflorescências) <sup>b</sup>	750,00	0,31	0,04

<sup>a</sup> rendimento baseado no peso seco

<sup>b</sup> rendimento baseado no peso fresco

Os maiores rendimentos foram obtidos a partir das plantas secas. A extração de óleo essencial a partir das inflorescências secas de *A. arenaria* apresentou um rendimento duas vezes maior que o rendimento obtido na extração com inflorescências frescas. A espécie *I. verum* apresentou o maior rendimento (5,33%), seguido por *C. citratus* (3,56%). Os menores rendimentos foram os das inflorescências frescas de *T. diversifolia* e *A. arenaria* (0,08 e 0,04%, respectivamente).

### 4.2. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais

O potencial antibacteriano dos óleos essenciais frente a micro-organismos bucais foi avaliado pelo método de microdiluição em microplaca segundo a metodologia preconizada pelo “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI, 2006). Os óleos essenciais foram testados nas concentrações de 0,97 a 2000 µg/mL e o controle positivo dicloridrato de clorexidina foi avaliado na faixa de concentrações de 0,01 a 5,9 µg/mL. Triplicatas de cada

concentração foram feitas para cada amostra analisada. Os resultados desses ensaios estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais de diferentes espécies vegetais e do controle dicloridrato de clorexidina sobre micro-organismos bucais.

<i>OE</i>	<i>S. mutans</i>		<i>S. salivarius</i>		<i>S. mitis</i>		<i>L. casei</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>S. sanguis</i>	
	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	CBM ( $\mu\text{g/mL}$ )										
<i>ZO</i>	1.000	2.000	2.000	2.000	250	500	1.000	2.000	2.000	-	-	-
<i>CC</i>	1.000	1.000	1.000	1.000	500	500	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000
<i>EG</i>	2.000	2.000	2.000	2.000	1.000	2.000	-	-	-	-	-	-
<i>IV</i>	-	-	-	-	2.000	2.000	-	-	-	-	-	-
<i>AAi</i>	15,63	62,5	250	250	31,25	31,25	125	250	2.000	2.000	2.000	2.000
<i>AAf</i>	250	250	1.000	1.000	250	250	125	500	2.000	-	2.000	2.000
<i>TDi</i>	250	250	2.000	2.000	125	250	1.000	2.000	-	-	-	-
<i>TDf</i>	1.000	1.000	-	-	1.000	1.000	2.000	-	-	-	-	-
<i>CHX</i>	0,18	0,18	0,37	0,37	1,48	1,48	1,48	5,90	2,95	5,90	2,95	5,90

*ZO*: *Zingiber officinale*; *CC*: *Cymbopogon citratus*; *EG*: *Eucalyptus globulus*; *IV*: *Illicium verum*; *AAi*: *Aldama arenaria* (inflorescências); *AAf*: *Aldama arenaria* (folhas); *TDi*: *Tithonia diversifolia* (inflorescências); *TDf*: *Tithonia diversifolia* (folhas); *CHX*: dicloridrato de clorexidina.

- : valores de CIM ou CBM acima de 2.000  $\mu\text{g/mL}$ .

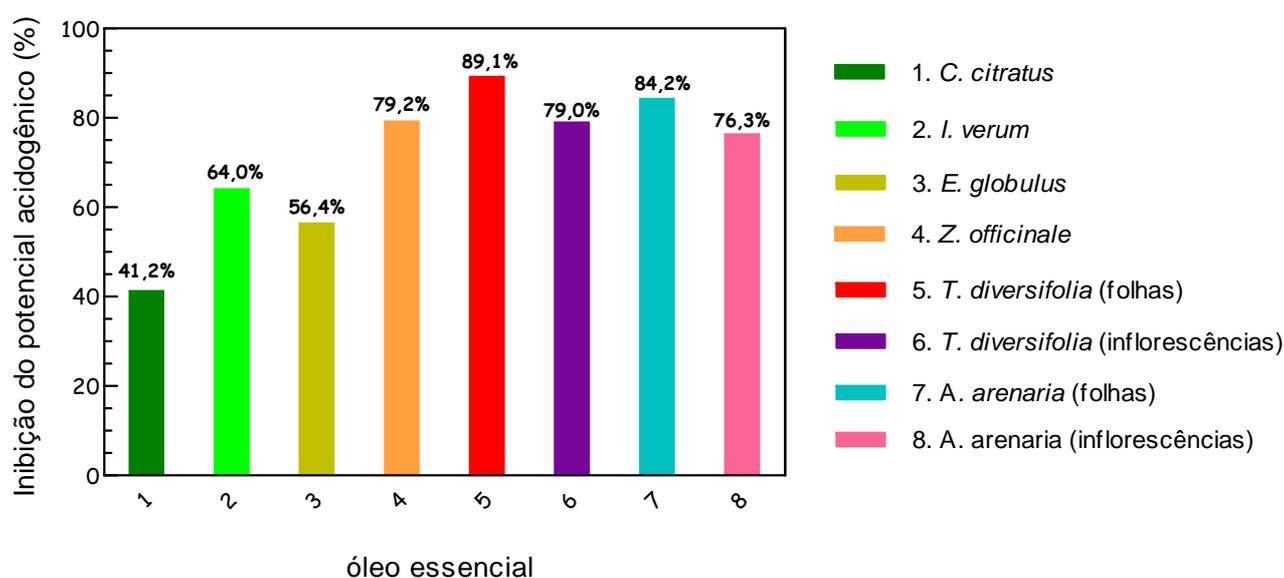
A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada segundo critérios da literatura que consideram óleos essenciais promissores aqueles que apresentam valores de CIM menores do que 100  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto óleos essenciais com valores de CIM maiores do que 1.000  $\mu\text{g/mL}$  são considerados inativos (GIBBONS, 2004, RIOS; RECIO, 2005). Ainda, Saleem e colaboradores, 2010, classificaram como óleos essenciais moderadamente ativos aqueles com valores de CIM entre 100 e 400  $\mu\text{g/mL}$ , e como fracamente ativos aqueles com valores de CIM entre 500 e 1.000  $\mu\text{g/mL}$ . Assim, com base nesses critérios, foi possível classificar o óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* ativo frente a *S. mutans* e *S. mitis*; e

moderadamente ativo contra *S. salivarius* e *L. casei*. Os óleos essenciais das folhas de *A. arenaria* e das inflorescências de *T. diversifolia* apresentaram-se moderadamente ativos frente à *S. mitis* e *S. mutans*, sendo o primeiro também moderadamente ativo contra *L. casei*. A espécie *Z. officinale* apresentou atividade moderada apenas contra *S. mitis*, micro-organismo contra qual o óleo essencial de *C. citratus* apresentou fraca atividade. Todos os óleos essenciais apresentaram-se inativos contra as bactérias *E. faecalis* e *S. sanguis* nas concentrações analisadas.

#### 4.3. Efeito dos óleos essenciais sobre o potencial acidogênico de *S. mutans in vitro* e determinação das curvas dose-efeito

Foram avaliados os efeitos inibitórios dos óleos essenciais sobre a produção glicolítica de ácidos em *S. mutans* incubados com excesso de substrato (glucose 10 mmol/L).

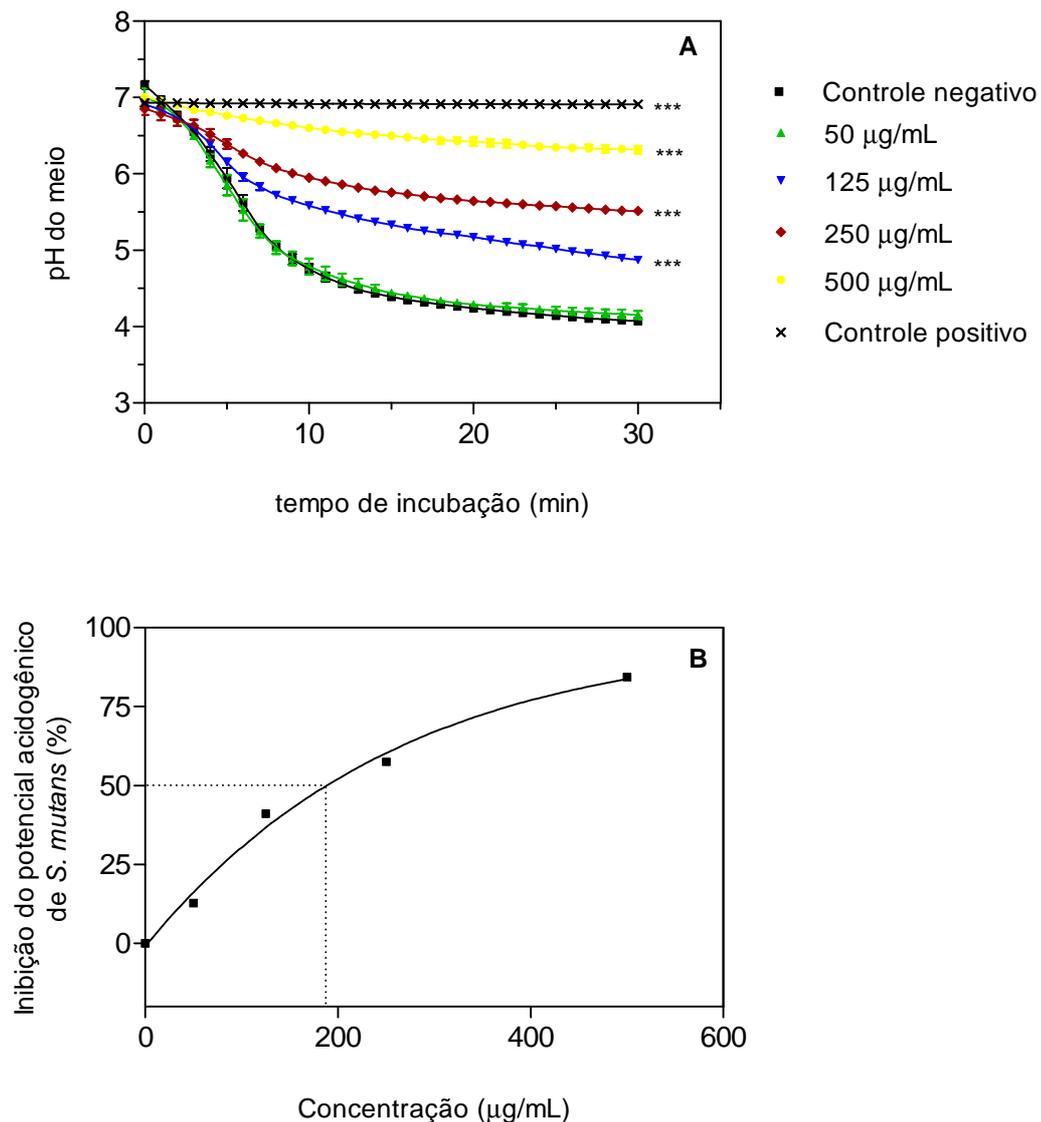
Na Figura 3 estão apresentados os percentuais de atividade inibitória estimados para cada óleo essencial na concentração de 125 µg/mL.



**Figura 3.** Atividade inibitória dos óleos essenciais em concentração de 125 µg/mL, sobre a produção de ácidos por *S. mutans* ATCC 25175.

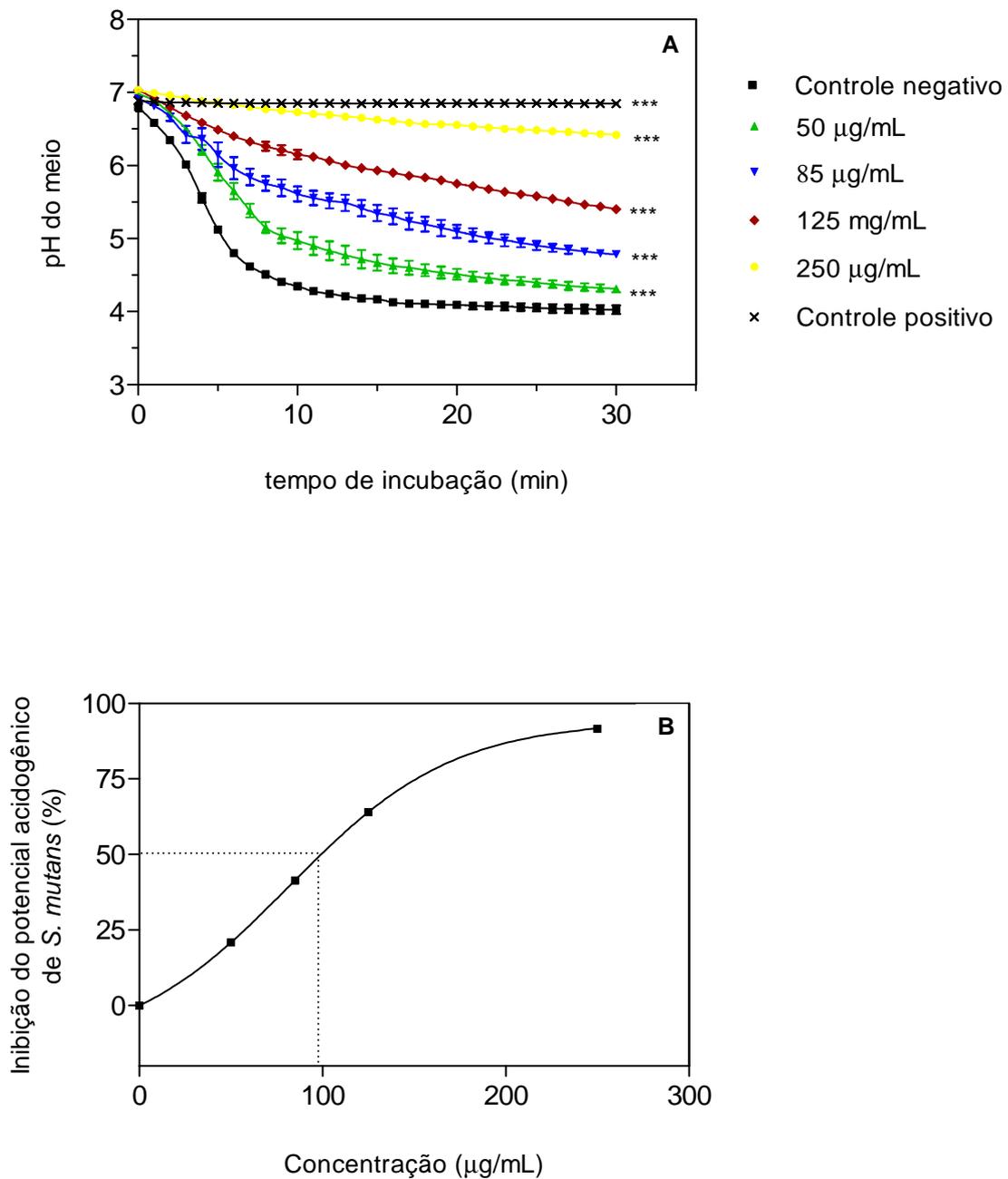
As curvas de cinética de pH relacionam a queda do pH do meio de suspensão de *S. mutans* que receberam tratamentos com concentrações seriadas dos óleos essenciais ao longo de 30 min de incubação. Os valores de área integrada obtidos com as curvas de pH *versus* tempo foram utilizados como parâmetro para determinação da porcentagem de inibição e construção das curvas dose-efeito dos óleos essenciais sobre o potencial acidogênico bacteriano. Nas

figuras 4 a 11 (páginas 34 a 41) estão apresentadas as curvas de cinética de pH (A) bem como as curvas dose-efeito (B) obtidas para cada óleo essencial. O controle positivo, onde não se observa a produção bacteriana de ácidos, corresponde à suspensão bacteriana tratada com digluconato de clorexidina 0,12% (concentração final). O controle negativo, onde se observa produção máxima de ácidos, corresponde à suspensão bacteriana incubada com DMSO 5%, concentração máxima de solvente utilizada para solubilizar os óleos essenciais.



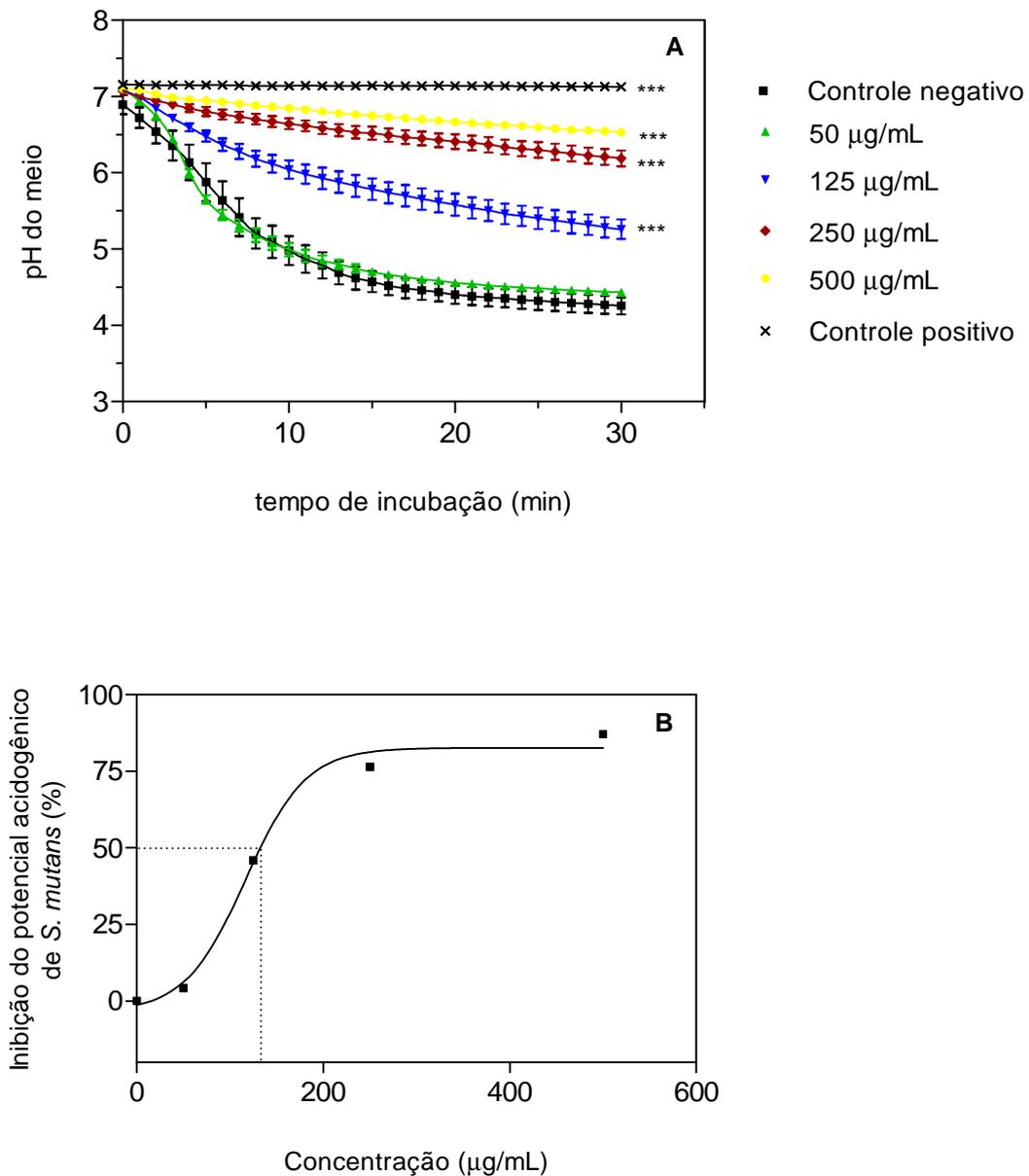
**Figura 4.** (A) Queda do pH do meio de suspensão de *S. mutans* ATCC 25175 tratados com concentrações seriadas do óleo essencial das folhas de *Cymbopogon citratus*. Os valores representam a média±SEM (n = 3). (B) Curva dose-efeito da concentração de óleo essencial *versus* efeito da atividade inibitória sobre o potencial acidogênico bacteriano. O valor de CI<sub>50</sub> é de 188,3 µg/mL.

\*\*\*( $p < 0,0001$ ) quando comparado ao controle negativo. *One-way* ANOVA, teste de Dunnett.



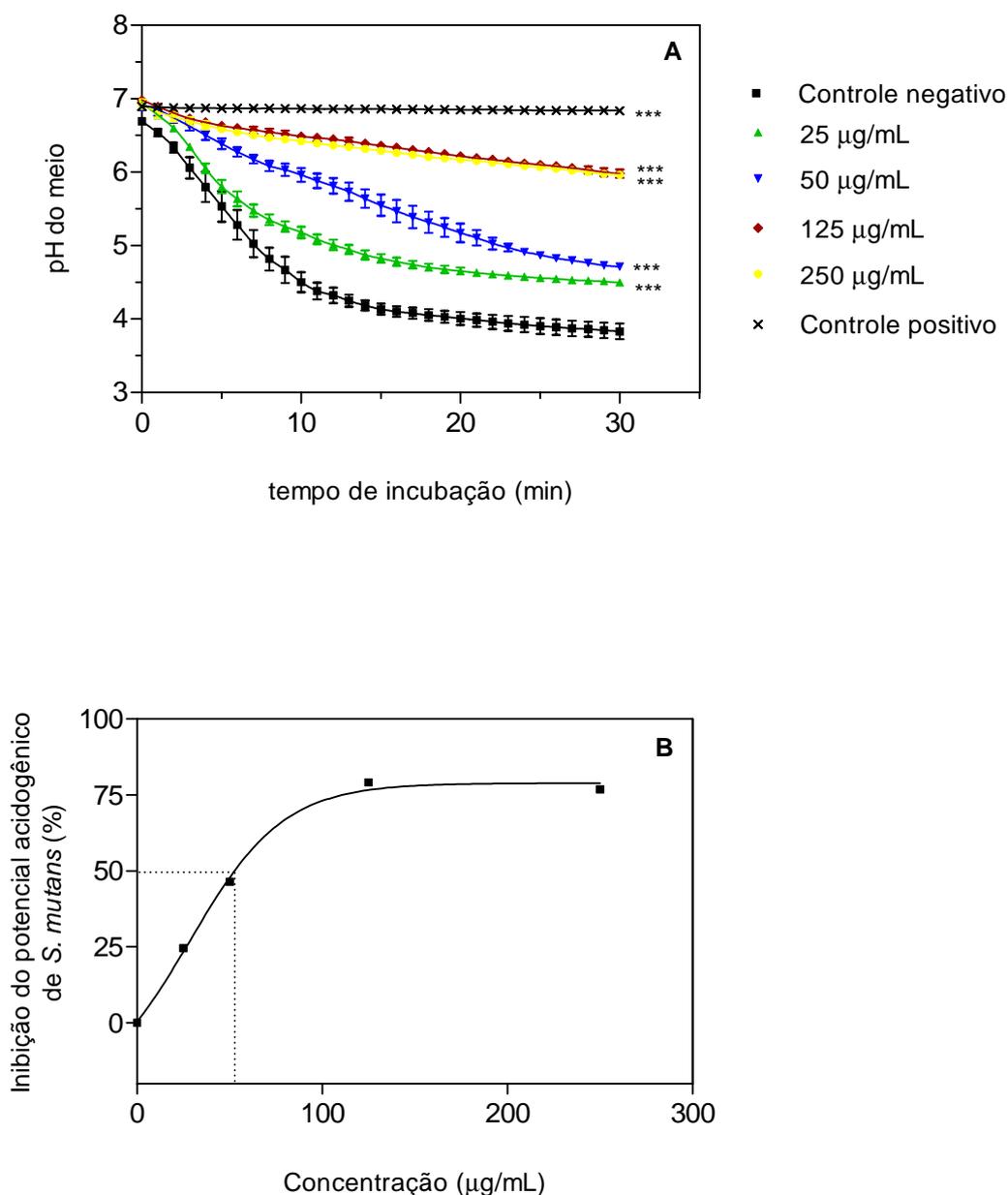
**Figura 5.** (A) Queda do pH do meio de suspensão de *S. mutans* ATCC 25175 tratados com concentrações seriadas do óleo essencial dos frutos de *Illicium verum*. Os valores representam a média±SEM (n = 3). (B) Curva dose-efeito da concentração de óleo essencial *versus* efeito da atividade inibitória sobre o potencial acidogênico bacteriano. O valor de  $CI_{50}$  é de 99,2 µg/mL.

\*\*\*( $p < 0,0001$ ) quando comparado ao controle negativo. *One-way* ANOVA, teste de Dunnett.



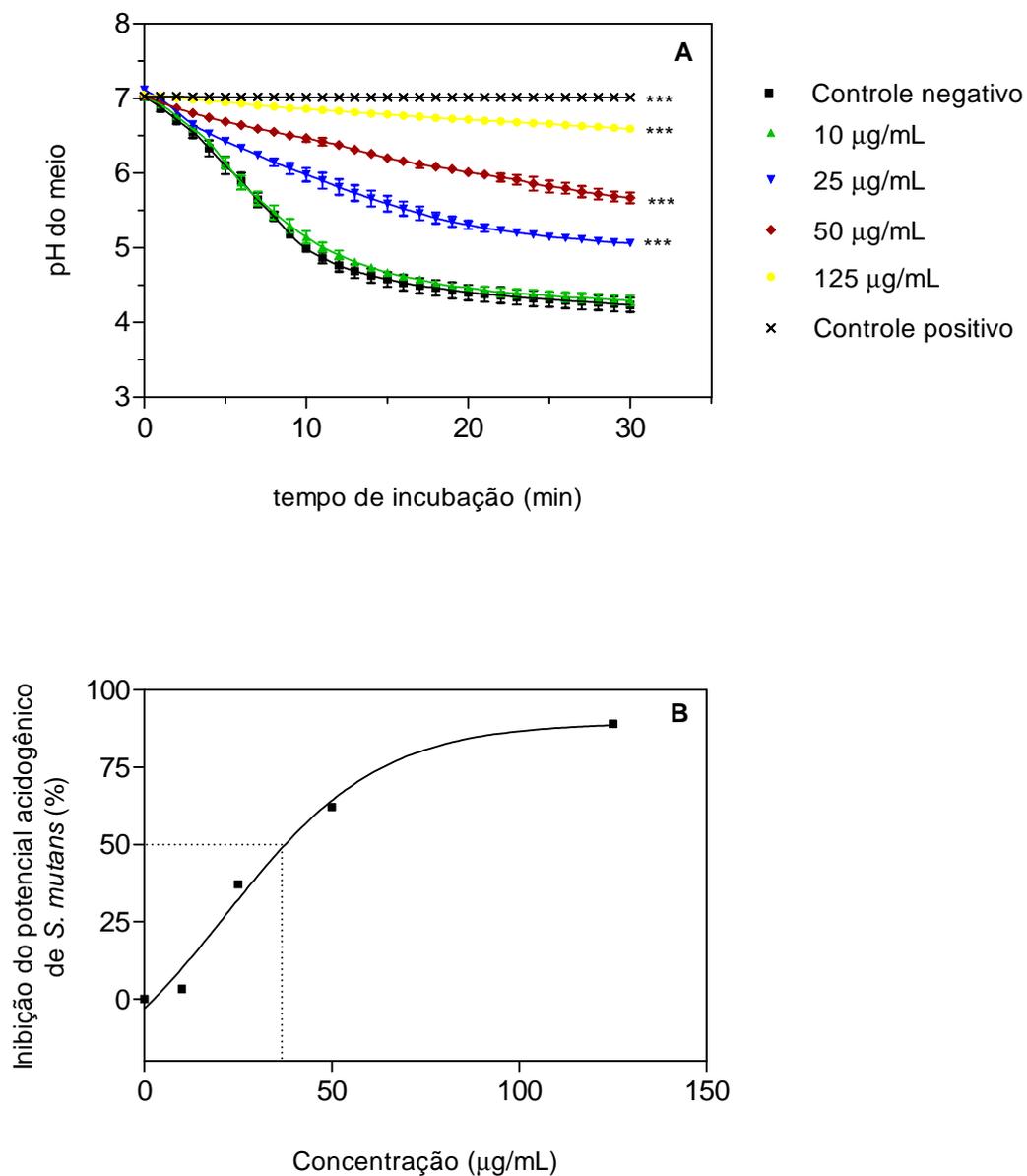
**Figura 6.** (A) Queda do pH do meio de suspensão de *S. mutans* ATCC 25175 tratados com concentrações seriadas do óleo essencial das folhas de *Eucalyptus globulus*. Os valores representam a média±SEM (n = 3). (B) Curva dose-efeito da concentração de óleo essencial *versus* efeito da atividade inibitória sobre o potencial acidogênico bacteriano. O valor de CI<sub>50</sub> é de 132,7 µg/mL.

\*\*\*(p<0,0001) quando comparado ao controle negativo. *One-way* ANOVA, teste de Dunnett.



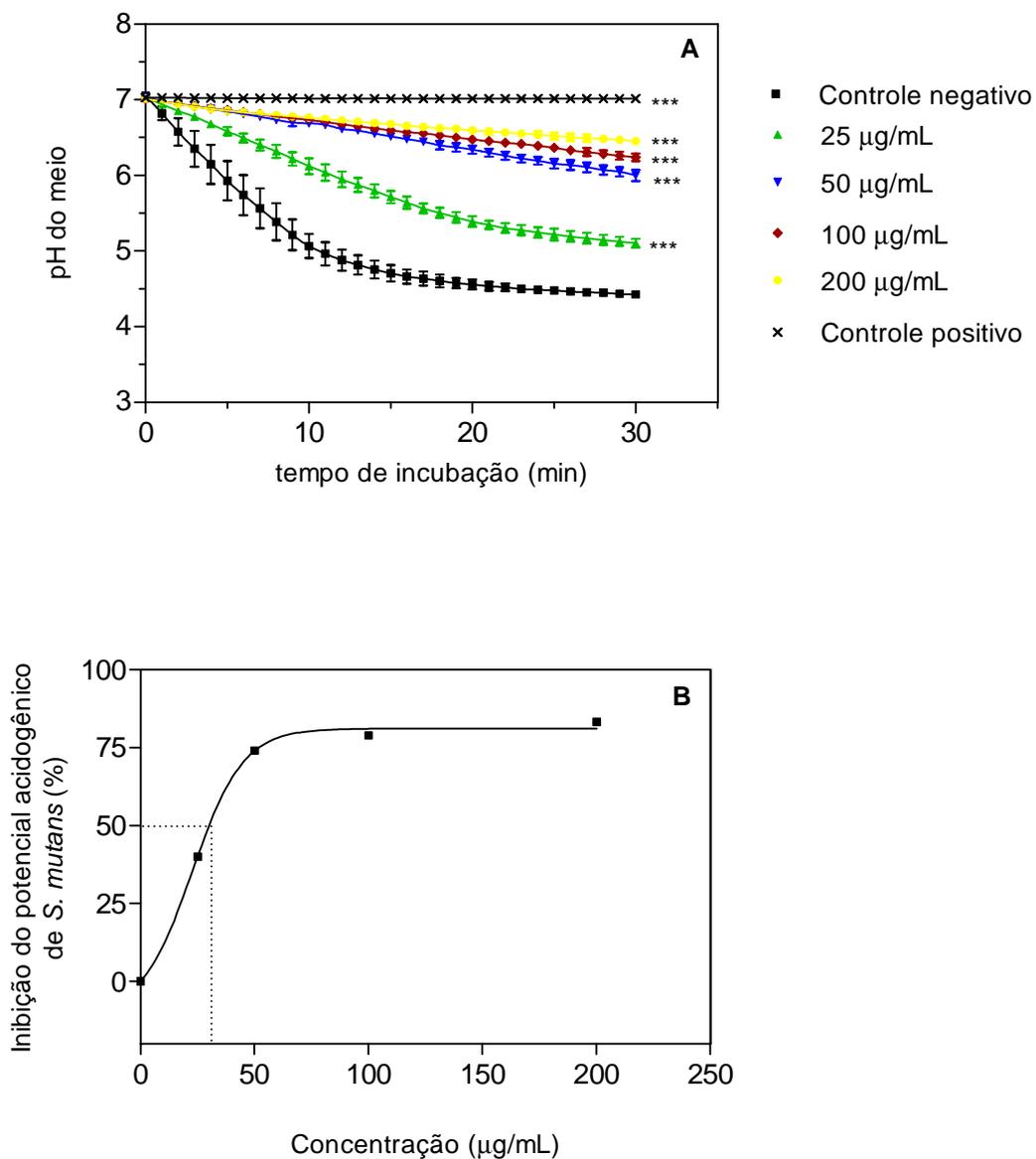
**Figura 7.** (A) Queda do pH do meio de suspensão de *S. mutans* ATCC 25175 tratados com concentrações seriadas do óleo essencial dos rizomas de *Zingiber officinale*. Os valores representam a média±SEM (n = 3). (B) Curva dose-efeito da concentração de óleo essencial *versus* efeito da atividade inibitória sobre o potencial acidogênico bacteriano. O valor de CI<sub>50</sub> é de 52,6 µg/mL.

\*\*\*( $p < 0,0001$ ) quando comparado ao controle negativo. *One-way* ANOVA, teste de Dunnett.



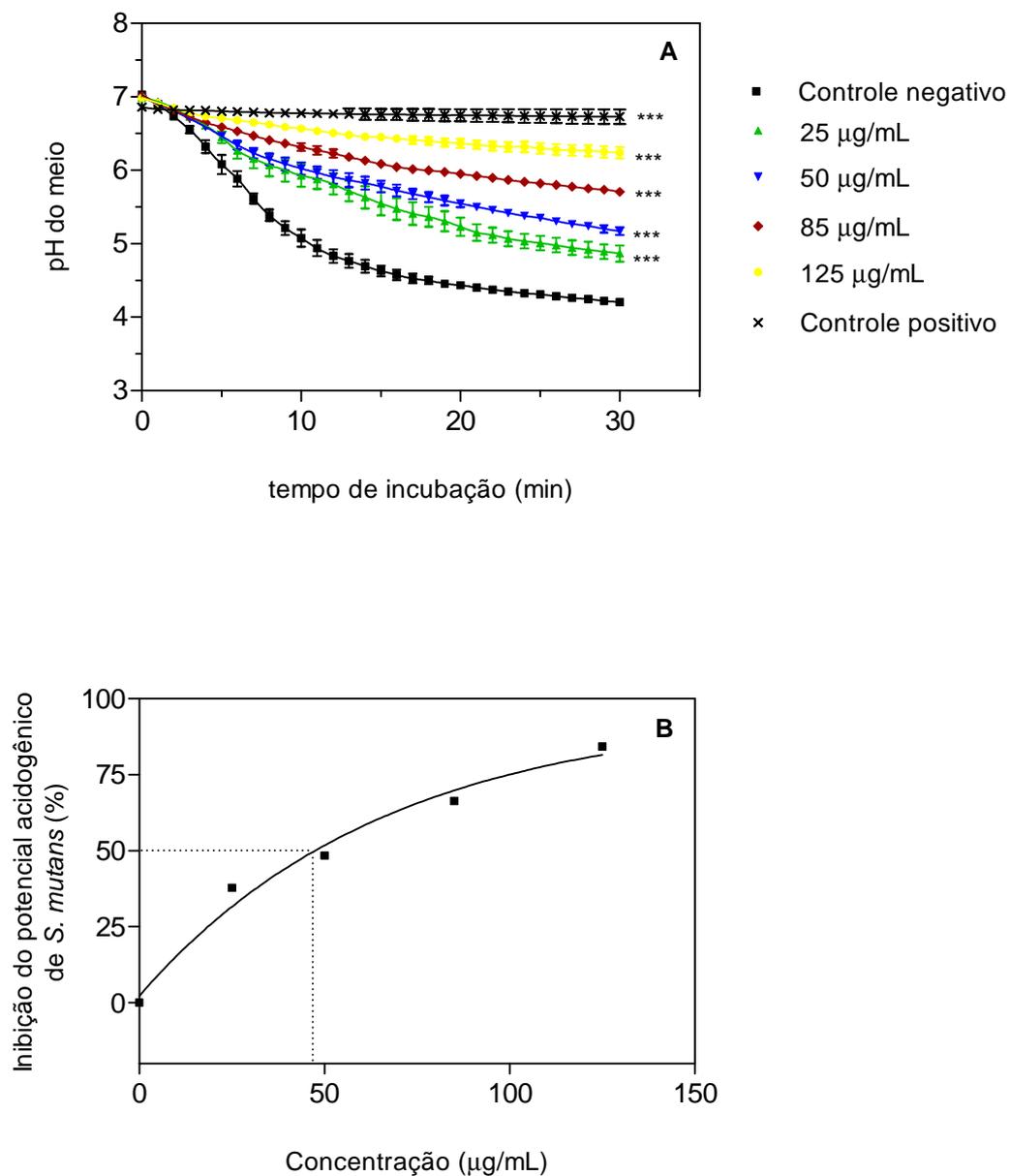
**Figura 8.** (A) Queda do pH do meio de suspensão de *S. mutans* ATCC 25175 tratados com concentrações seriadas do óleo essencial das folhas de *Tithonia diversifolia*. Os valores representam a média±SEM (n = 3). (B) Curva dose-efeito da concentração de óleo essencial *versus* efeito da atividade inibitória sobre o potencial acidogênico bacteriano. O valor de CI<sub>50</sub> é de 37,6 µg/mL.

\*\*\*( $p < 0,0001$ ) quando comparado ao controle negativo. *One-way* ANOVA, teste de Dunnett.



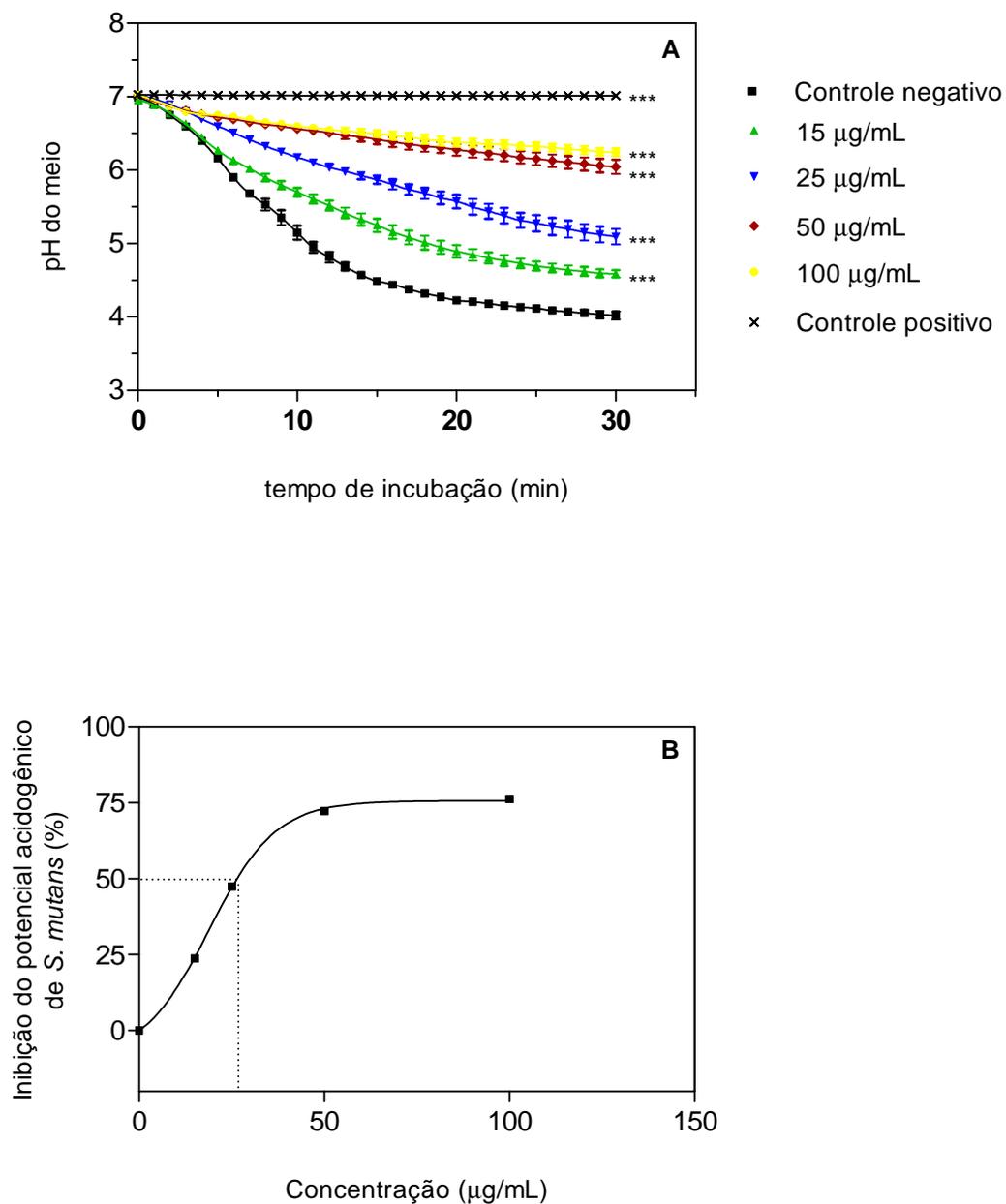
**Figura 9.** (A) Queda do pH do meio de suspensão de *S. mutans* ATCC 25175 tratados com concentrações seriadas do óleo essencial das inflorescências de *Tithonia diversifolia*. Os valores representam a média±SEM (n = 3). (B) Curva dose-efeito da concentração de óleo essencial *versus* efeito da atividade inibitória sobre o potencial acidogênico bacteriano. O valor de CI<sub>50</sub> é de 30,0 µg/mL.

\*\*\*(p<0,0001) quando comparado ao controle negativo. *One-way* ANOVA, teste de Dunnett.



**Figura 10.** (A) Queda do pH do meio de suspensão de *S. mutans* ATCC 25175 tratados com concentrações seriadas do óleo essencial das folhas de *Aldama arenaria*. Os valores representam a média±SEM (n = 3). (B) Curva dose-efeito da concentração de óleo essencial *versus* efeito da atividade inibitória sobre o potencial acidogênico bacteriano. O valor de CI<sub>50</sub> é de 47,4 µg/mL.

\*\*\*( $p < 0,0001$ ) quando comparado ao controle negativo. *One-way* ANOVA, teste de Dunnett.



**Figura 11.** (A) Queda do pH do meio de suspensão de *S. mutans* ATCC 25175 tratados com concentrações seriadas do óleo essencial das inflorescências de *Aldama arenaria*. Os valores representam a média±SEM (n = 3). (B) Curva dose-efeito da concentração de óleo essencial *versus* efeito da atividade inibitória sobre o potencial acidogênico bacteriano. O valor de CI<sub>50</sub> é de 26,5 µg/mL.

\*\*\*( $p < 0,0001$ ) quando comparado ao controle negativo. *One-way* ANOVA, teste de Dunnett.

Todos os óleos essenciais analisados reduziram o potencial acidogênico bacteriano de forma dose-dependente. Uma redução significativa na produção de ácidos ocorreu na presença de concentrações maiores ou iguais a 125 µg/mL de óleo essencial das folhas de *C. citratus* e *E. globulus*, concentrações maiores ou iguais a 50 µg/mL do óleo essencial dos frutos de *I. verum*, concentrações maiores ou iguais a 25 µg/mL do óleo extraído dos rizomas de *Z. officinale*, das folhas e inflorescências de *T. diversifolia* e das folhas de *A. arenaria* e concentrações maiores ou iguais a 15 µg/mL de óleo essencial extraído das inflorescências de *A. arenaria*.

Na figura 3 (página 33), observa-se que os óleos com maior atividade inibitória (na concentração de 125 µg/mL) foram os óleos das folhas de *T. diversifolia* e *A. arenaria* (89,1 e 84,2% de inibição sobre a produção de ácidos, respectivamente, quando comparados com o digluconato de clorexidina 0,12%). No entanto, quando comparadas as  $CI_{50}$  obtidas a partir das curvas dose-efeito (figuras 4B a 11B, páginas 34 a 41), os óleos com menores concentrações capazes de inibir 50% da produção de ácidos foram os óleos essenciais das inflorescências de *A. arenaria* e *T. diversifolia* ( $CI_{50}$  iguais a 26,5 e 30,0 µg/mL, respectivamente).

#### 4.4. Seleção do óleo essencial

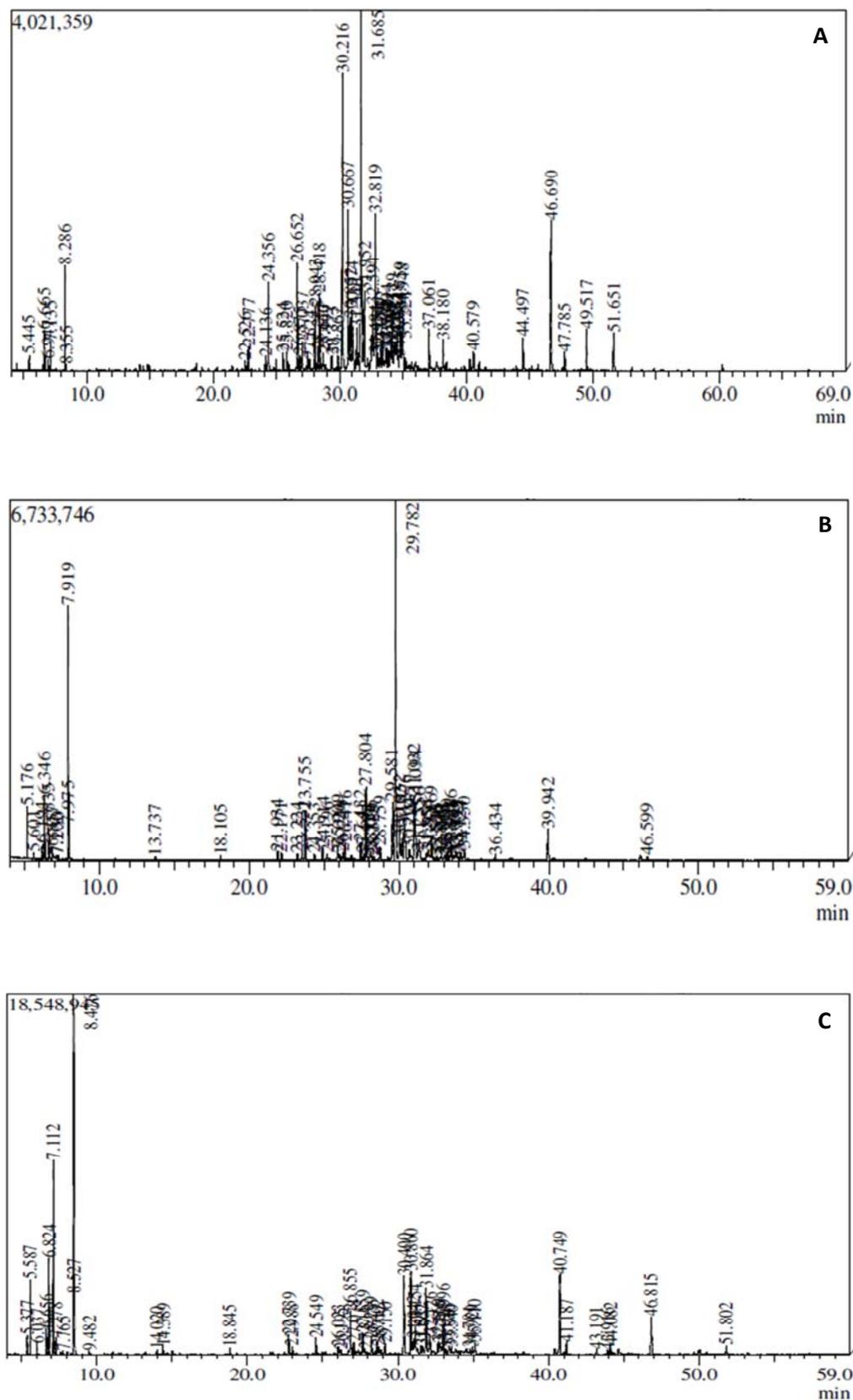
Através da análise dos resultados obtidos nos ensaios de atividade antimicrobiana e dos ensaios glicolíticos da produção de ácidos por *S. mutans*, o óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* (Figura 12, página 43) foi escolhido como o mais promissor dentre os óleos avaliados. Este óleo apresentou CIM igual a 15,63 µg/mL e CBM igual a 61,5 µg/mL para *S. mutans*, micro-organismo considerado um dos agentes causadores primários da cárie dental. Além disso, também apresentou atividade significativa contra *L. casei*, *S. mitis* e *S. salivarius*, com concentrações bactericidas equivalentes a 250, 31,25 e 250 µg/mL, respectivamente. O valor de  $CI_{50}$  para a produção bacteriana de ácidos foi igual a 26,5 µg/mL. Assim, devido à atividade promissora em menores concentrações do que os outros componentes voláteis analisados, este óleo essencial foi selecionado para as etapas seguintes do projeto.



**Figura 12.** Inflorescências de *Aldama arenaria* coletadas na Rodovia Washington Luiz, S.P., km 223. Na foto podem-se observar as flores agrupadas em capítulos radiados, flores do raio amarelas em um verticilo, flores do disco amarelas e tubulosas e brácteas involucrais verdes em 4 a 5 séries (Fonte: arquivo pessoal).

#### **4.5. Análise fitoquímica do óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria***

O óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* possui cor amarelada e odor forte cítrico-adocicado. Depois de selecionado este óleo para prosseguir com os estudos, foram realizadas novas coletas das inflorescências de *A. arenaria* no mesmo local que a primeira coleta (fevereiro de 2012). Assim, como esta espécie floresce apenas uma vez por ano, entre os meses de fevereiro e março, foram realizadas coletas nos períodos de fevereiro de 2012, fevereiro de 2013 e fevereiro de 2014. Todos os óleos essenciais extraídos das inflorescências coletadas em diferentes épocas foram caracterizados quimicamente. Na Figura 13 (página 44), encontram-se os cromatogramas obtidos para os óleos das coletas de fevereiro de 2012, 2013 e 2014, enquanto as Tabelas 5 a 7 (páginas 45, 46 e 47) apresentam os constituintes químicos identificados em cada óleo.



**Figura 13.** Cromatogramas dos óleos essenciais das inflorescências de *Aldama arenaria* coletadas em (A) fevereiro de 2012, (B) fevereiro de 2013 e (C) fevereiro de 2014, obtidos por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas.

**Tabela 5.** Substâncias identificadas no óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* coletadas em fevereiro de 2012.

Pico	Tempo de Retenção(min)	Composto identificado	Porcentagem relativa	IS	IK	IK literatura
1	5,4	$\alpha$ -pineno	0,24	95	931	933
2	6,7	$\beta$ -pineno	0,80	96	976	980
3	6,9	$\beta$ -mirceno	0,19	95	987	988
4	7,1	óxido de cicloocteno	0,62	90	994	-
5	8,3	limoneno	2,41	95	1027	1031
6	8,4	$\beta$ -felandreno	0,11	90	1029	1030
7	22,5	$\alpha$ -copaeno	0,28	94	1372	1376
9	24,1	$\alpha$ -bergamoteno	0,47	94	1410	1434
10	24,4	$\alpha$ -santaleno	3,18	91	1415	1419
11	25,5	epi- $\beta$ -santaleno	0,52	95	1443	1449
12	25,8	$\alpha$ -cariofileno	0,59	90	1450	1451
13	26,7	$\gamma$ -muroloeno	3,49	95	1470	1477
14	26,9	germacreno D	0,40	94	1476	1474
15	27,0	epi- $\beta$ -fameseno	0,88	94	1480	1471
17	27,6	$\alpha$ -muroloeno	0,34	91	1494	1499
18	28,0	$\beta$ -bisaboleno	2,00	96	1504	1509
19	28,3	cubebol	0,59	88	1510	1513
20	28,4	teresantalol	2,46	87	1513	-
24	30,2	ni	12,09	79	1559	1568
25	30,7	espatulenol	5,48	96	1570	1576
26	30,9	óxido de cariofileno	2,69	93	1575	1575
27	31,0	ni	3,52	84	1578	1582
28	31,3	veridiflorol	1,16	91	1587	1590
30	31,7	carotol	12,71	95	1596	1594
31	32,0	ni	2,31	82	1603	-
33	32,6	ni	2,30	81	1620	-
34	32,8	ni	6,31	81	1626	-
35	33,0	undecan-3-ol	0,40	92	1630	1636
36	33,2	daucol	0,70	88	1636	1642
37	33,4	torreiol	0,82	91	1641	1645
39	33,9	<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamotol	0,45	86	1654	1654
41	34,1	ni	1,37	84	1661	-
44	34,5	ni	1,11	84	1671	-
46	34,8	ni	2,06	86	1678	-
47	34,9	cis-lanceol	3,50	89	1683	-
48	35,2	$\alpha$ -santalol	0,27	91	1690	1683
49	37,1	$\beta$ -sinensal	1,29	93	1741	-
52	44,5	ácido palmítico	1,04	94	1958	1960
53	46,7	falcarinol	6,71	86	2026	2028
55	49,5	ni	1,45	74	2118	-
56	51,7	ni	1,41	81	2189	-

1 a 6 são monoterpenos; 7 a 56 são sesquiterpenos ou não terpenóides. Picos não identificados (ni) abaixo de 1% não estão apresentados na tabela.

**Tabela 6.** Substâncias identificadas no óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* coletadas em fevereiro de 2013.

Pico	Tempo de retenção (min)	Composto identificado	Porcentagem relativa	IS	IK	IK literatura
1	5,2	$\alpha$ -pineno	1,81	98	931	939
2	5,6	canfeno	0,22	92	948	947
3	6,2	sabineno	0,56	95	971	969
4	6,3	$\beta$ -pineno	2,58	96	976	980
5	6,6	$\beta$ -mirceno	1,44	96	988	988
6	6,9	óxido de cicloocteno	0,56	90	996	-
7	7,1	pseudolimoneno	0,14	87	1004	1003
8	7,3	3-careno	0,17	90	1008	1011
9	7,9	limoneno	11,76	96	1027	1031
10	8,0	$\beta$ -felandreno	1,40	90	1029	1030
11	13,7	4-terpineol	0,20	89	1179	1177
12	18,1	bornil acetato	0,23	92	1282	1285
13	21,9	$\alpha$ -copaeno	0,52	94	1372	1376
15	23,2	$\alpha$ -gurjuneno	0,36	92	1402	1409
17	23,8	$\alpha$ -santaleno	3,71	95	1415	1419
18	24,4	<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoteno	0,54	93	1430	1436
19	24,9	epi- $\beta$ -santaleno	0,82	96	1443	1449
20	25,2	$\alpha$ -cariofileno	0,38	93	1450	1451
21	25,9	$\gamma$ -gurjuneno	1,04	92	1467	1473
22	26,0	$\gamma$ -muroleno	0,39	89	1470	1477
23	26,2	germacreno D	0,56	92	1476	1474
24	26,4	epi- $\beta$ -fameseno	1,16	93	1480	1471
25	27,4	$\beta$ -bisaboleno	1,17	96	1505	1509
27	27,8	teresantalol	5,13	88	1514	-
32	29,6	ni	4,57	79	1559	-
33	29,8	palustrol	25,13	96	1564	1568
34	30,0	espatulenol	2,32	94	1571	1576
36	30,4	santalol	4,57	85	1579	-
37	30,7	viridiflorol	0,59	90	1588	1590
38	31,0	carotol	4,63	89	1596	1594
39	31,1	ni	3,66	88	1598	-
54	34,4	cis-lanceol	0,89	87	1685	-
55	36,4	$\beta$ -sinensal	0,40	90	1742	-
56	39,9	ni	2,13	88	1842	-

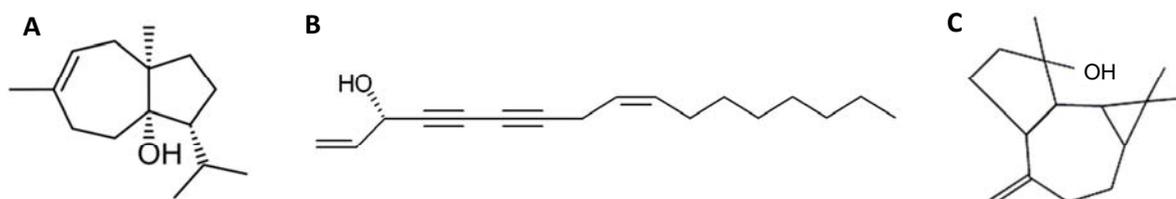
1 a 11 são monoterpenos; 12 a 56 são sesquiterpenos ou não terpenóides. Picos não identificados (ni) abaixo de 1% não estão apresentados na tabela.

**Tabela 7.** Substâncias identificadas no óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* coletadas em fevereiro de 2014.

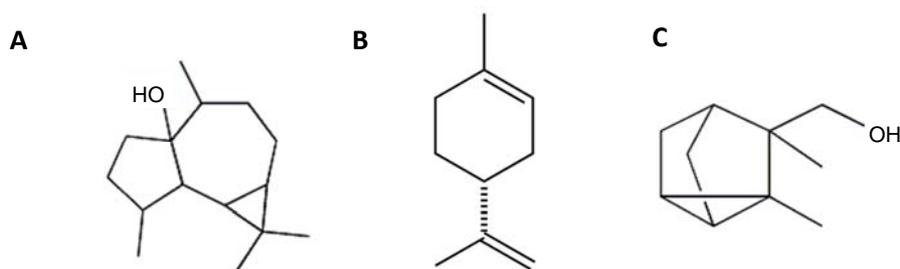
Pico	Tempo de retenção (min)	Composto identificado	Porcentagem relativa	IS	IK	IK literatura
1	5,4	$\alpha$ -tujeno	0,72	97	924	923
2	5,6	$\alpha$ -pineno	2,99	99	931	933
3	6,0	canfeno	0,49	97	948	947
4	6,7	sabineno	1,16	97	971	969
5	6,8	$\beta$ -pineno	4,24	97	977	980
6	7,1	$\beta$ -mirceno	8,64	99	987	988
7	7,3	óxido de cicloocteno	0,82	91	993	-
8	7,8	3-careno	0,18	95	1008	1011
9	8,5	limoneno	19,88	95	1028	1031
10	8,5	$\beta$ -felandreno	2,29	94	1029	1030
11	9,5	$\gamma$ -terpineno	0,22	95	1055	1062
13	14,4	4-terpineol	0,54	96	1178	1177
14	18,8	bornil acetato	0,41	97	1282	1285
15	22,7	$\alpha$ -copaeno	1,43	96	1372	1376
17	24,5	$\beta$ -cariofileno	1,18	96	1415	1415
18	26,0	$\alpha$ -cariofileno	0,48	94	1451	1455
19	26,2	aromadendreno	0,27	95	1455	1452
20	26,9	$\gamma$ -muroloeno	3,00	95	1471	1477
21	27,1	germacreno D	0,8	95	1476	1474
22	27,7	biciclogermacreno	1,93	94	1491	1488
23	27,8	$\alpha$ -muroloeno	0,37	93	1494	1499
24	28,2	$\beta$ -bisaboleno	1,06	96	1505	1509
25	28,6	cadineno	0,88	92	1514	1524
26	28,7	calameneno	0,53	93	1517	1521
27	29,2	cadinadieno	0,64	94	1528	1528
28	30,4	ni	6,91	79	1560	-
29	30,9	espatulenol	6,39	97	1571	1576
30	31,0	óxido de cariofileno	1,34	92	1576	1581
31	31,2	ledenóxido	1,83	87	1579	-
34	31,9	carotol	5,76	94	1597	1594
35	32,1	ni	1,75	82	1604	-
38	33,0	ni	2,04	83	1627	-
41	33,5	torreiol	0,45	92	1641	1645
44	35,1	lanceol	0,96	88	1683	-
45	40,7	ácido cetocaprílico	6,26	87	1841	-
50	46,8	ni	3,46	80	2025	-

1 a 13 são monoterpenos (7 é não terpenóide); 14 a 50 são sesquiterpenos ou não terpenóides. Picos não identificados (ni) abaixo de 1% não estão apresentados na tabela.

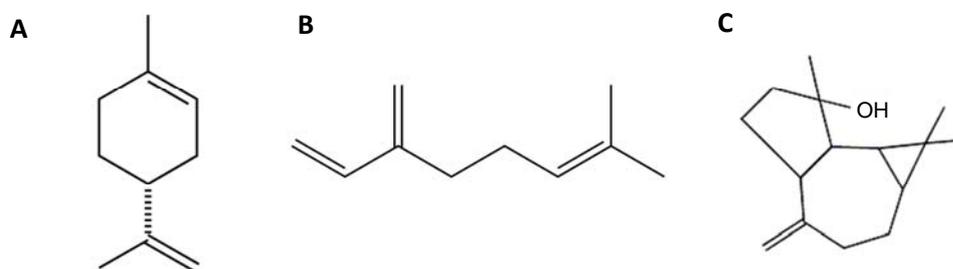
Os óleos essenciais provenientes das inflorescências de diferentes coletas apresentaram mudanças qualitativas e quantitativas em sua composição, inclusive entre os componentes majoritários. As estruturas químicas dos metabólitos majoritários identificados nos óleos essenciais obtidos em fevereiro de 2012, 2013 e 2014 estão apresentadas nas Figuras 14, 15 e 16, respectivamente.



**Figura 14.** Estruturas químicas dos constituintes majoritários (A) carotol (12,67%), (B) falcarinol (6,71%) e (C) espatulenol (5,48%), identificados no óleo essencial das inflorescências de *Aldama arenaria* coletadas em fevereiro de 2012.



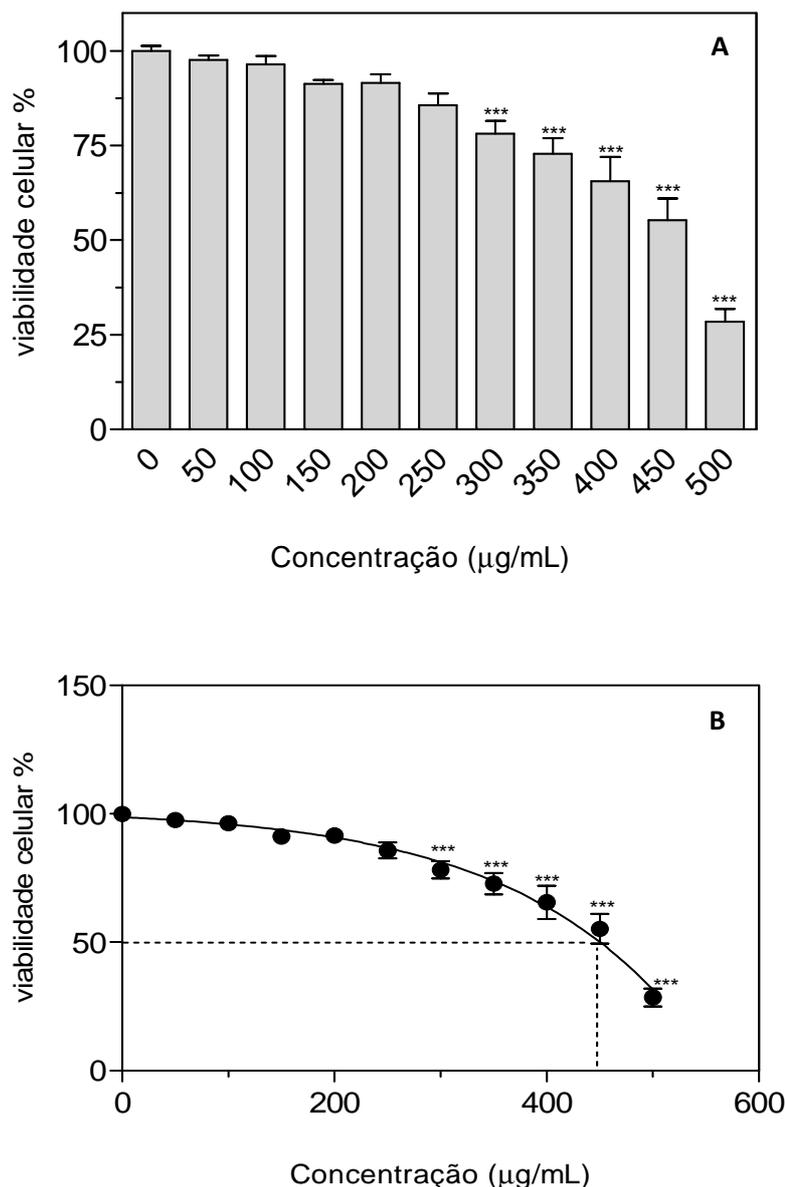
**Figura 15.** Estruturas químicas dos constituintes majoritários (A) palustrol (25,13%), (B) limoneno (11,76%) e (C) teresantalol (5,13%), identificados no óleo essencial das inflorescências de *Aldama arenaria* coletadas em fevereiro de 2013.



**Figura 16.** Estruturas químicas dos constituintes majoritários (A) limoneno (19,88%), (B)  $\beta$ -mirceno (8,64%) e (C) espatulenol (6,39%), identificados no óleo essencial das inflorescências de *Aldama arenaria* coletadas em fevereiro de 2014.

#### 4.6. Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria*

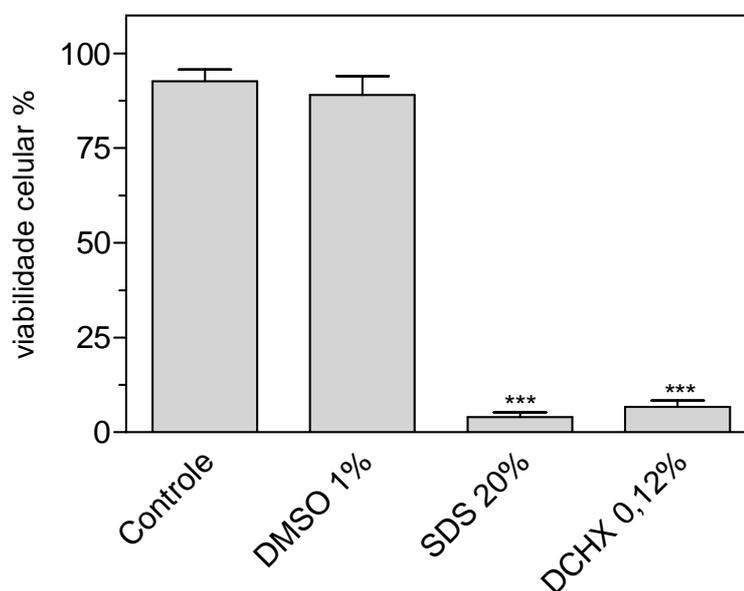
Os resultados dos efeitos de concentrações seriadas do óleo essencial de *A. arenaria* obtido em fevereiro de 2012 sobre a proliferação de fibroblastos gengivais humanos *in vitro* estão representados graficamente na Figura 17. A viabilidade celular foi medida e expressa em termos da absorvância relativa das células tratadas e não tratadas (controle).



**Figura 17.** (A) Efeitos sobre a viabilidade de fibroblastos gengivais humanos após 30 min de incubação com concentrações seriadas de óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria*, avaliados pelo método MTT. Os valores representam a média±SEM (n = 3). (B) Curva dose-efeito da concentração de óleo essencial *versus* porcentagem de viabilidade celular. O valor de CI<sub>50</sub> é de 450,6 µg/mL.

\*\*\*p < 0,0001 quando comparados ao grupo controle (concentração zero de óleo essencial). One-way ANOVA, teste de Dunnett.

O óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* não afetou a viabilidade celular em concentrações até 250 µg/mL ( $p>0,05$ ). Reduções significativas na proliferação foram detectadas em concentrações iguais ou acima de 300 µg/mL, a qual ainda permitiu aproximadamente 78% do crescimento celular. A concentração responsável por inibir 50% da proliferação dos fibroblastos foi estabelecida em 450,6 µg/mL (figura 17B, página 49). Os controles realizados estão apresentados na Figura 18. O digluconato de clorexidina 0,12% não apresentou diferença significativa em relação à citotoxicidade induzida por dodecilsulfato de sódio 20%, utilizado como controle negativo. O solvente DMSO na concentração utilizada para solubilizar o óleo não apresentou interferência sobre a proliferação.



**Figura 18.** Efeitos sobre a viabilidade de fibroblastos gengivais humanos após 30 min de incubação com dimetilsulfóxido (DMSO 1%), dodecilsulfato de sódio (SDS 20%) e digluconato de clorexidina (DCHX 0,12%), avaliados pelo método MTT. Os valores representam a média±SEM (n = 3).

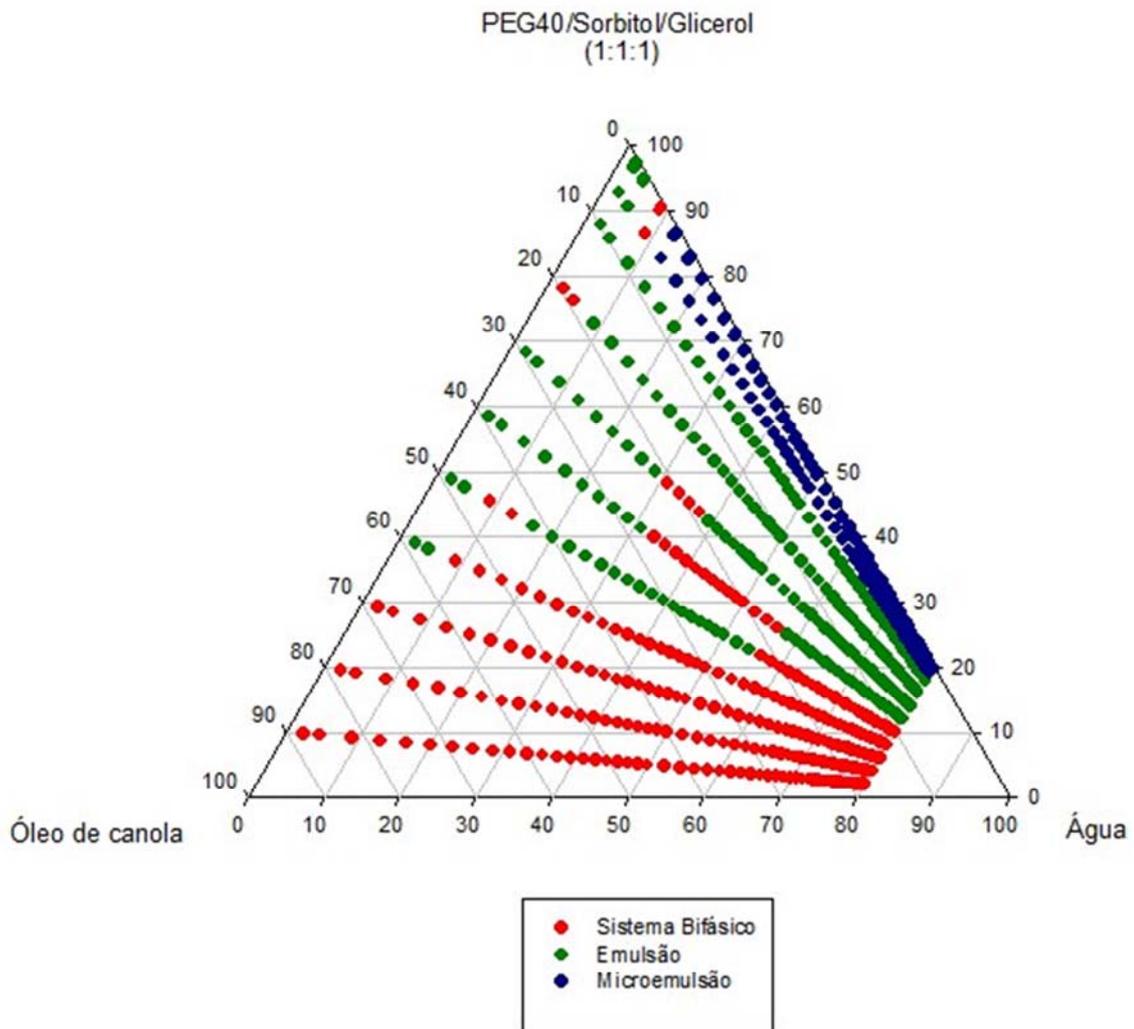
\*\*\* $p<0.0001$  quando comparados ao grupo controle (não tratado). One-way ANOVA, teste de Dunnett.

#### 4.7. Preparo e caracterização do enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria*

##### 4.7.1. Formulação do enxaguatório bucal

O diagrama de fases pseudo-ternário preparado com fase oleosa composta por óleo de canola, fase aquosa por água e mistura de tensoativos e cotensoativo composta por PEG 40 (óleo de rícino hidrogenado e etoxilado), sorbitol e glicerol na proporção 1:1:1 está

apresentado na Figura 19. O diagrama foi previamente desenvolvido e caracterizado por Leite e colaboradores, 2008.



**Figura 19.** Diagrama de fases pseudo-ternário formado por PEG40/Sorbitol/Glicerol (1:1:1), óleo de canola e água.

Através do diagrama de fases obtido, escolheram-se as seguintes proporções para a obtenção de uma microemulsão: 19,86% de tensoativos, 0,20% de fase oleosa e 79,94% de fase aquosa.

A composição final da formulação de enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* está apresentada na Tabela 8 (página 52).

**Tabela 8.** Composição final da formulação de enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de *Aldama arenaria*.

Componente	Quantidade (% m/v)
Óleo essencial <i>A. arenaria</i>	0,025
PEG 40	6,62
Sorbitol	6,62
Glicerol	6,62
Óleo de canola	0,10
Mentol	0,40
Metilparabeno	0,10
Fluoreto de sódio	0,05
Sacarina sódica	0,07
Benzoato de sódio	0,10
Água purificada	q.s.p. 100,00

#### 4.7.2. Caracterização físico-química da microemulsão

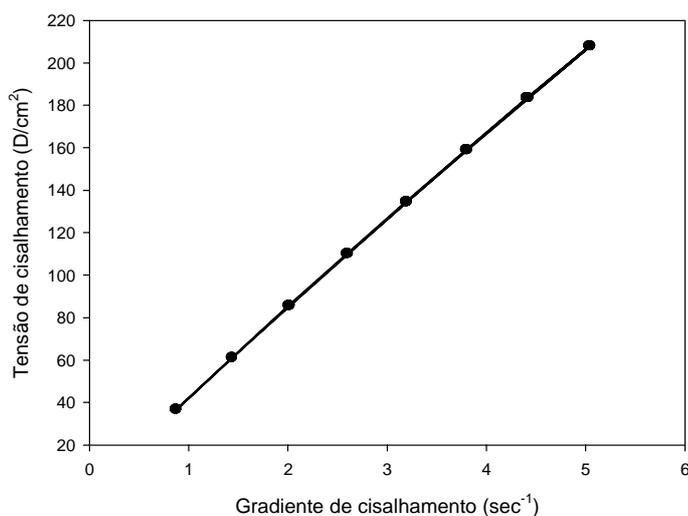
Através da inspeção visual, o enxaguatório bucal obtido apresentou-se um sistema transparente e sem formação de fases. A análise por microscopia de luz polarizada confirmou a obtenção de um sistema isotrópico, uma vez que a microemulsão não promoveu desvio no plano da luz polarizada e não apresentou birrefringência.

Após a centrifugação por 30 min, 956 g, à temperatura ambiente, não houve precipitação de partículas e separação de fases.

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados obtidos para alguns parâmetros físico-químicos analisados, enquanto na Figura 20 (página 53) pode-se observar o comportamento reológico determinado para o enxaguatório bucal.

**Tabela 9.** Caracterização físico-química da formulação de enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de *Aldama arenaria*.

Característica	Resultado
Tamanho das gotículas (nm)	24,96 ( $\pm 1,88$ )
Índice de polidispersividade	0,214 ( $\pm 0,04$ )
Potencial zeta (mV)	-1,21 ( $\pm 0,29$ )
Condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	1246,67 ( $\pm 64,29$ )
Densidade (g/mL)	1,22
Viscosidade (cP)	2,28
pH	6,56



**Figura 20.** Comportamento reológico da formulação de enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de *Aldama arenaria*, com utilização de *spindle* SC4-18.

#### 4.8. Avaliação da dispersão do óleo essencial no enxaguatório bucal

##### 4.8.1. Fracionamento do enxaguatório bucal contendo óleo essencial por partição líquido-líquido e caracterização química das frações orgânicas

Foram realizadas partições líquido-líquido do enxaguatório com e sem óleo essencial utilizando-se solventes de diferentes polaridades (n-hexano e acetato de etila). Após a partição e evaporação do solvente, os frascos foram pesados para cálculos da quantidade de massa extraída no processo. Os valores obtidos nas extrações por partição estão apresentados na Tabela 10.

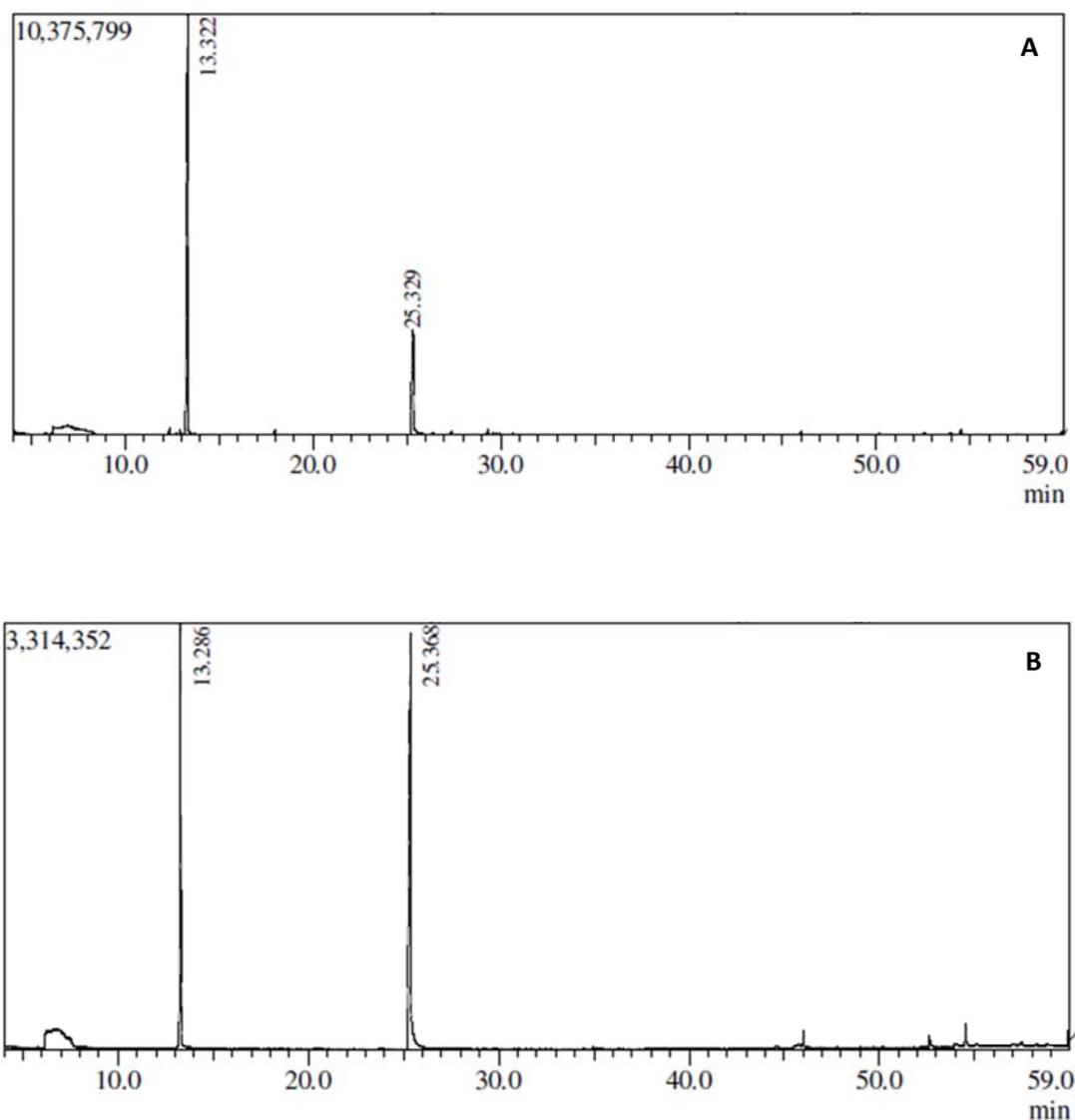
**Tabela 10.** Massas extraídas nas partições com n-hexano e acetato de etila dos enxaguatórios bucais com e sem óleo essencial.

	Fração Hexânica	Fração Acetato
Massa FOE <sup>a</sup> (mg)	45,7	134,4
Massa FB <sup>b</sup> (mg)	42,8	83,3
Massa FOE - FB (mg)	2,9	51,1
<b>Massa total da extração (mg)</b>	<b>54,0</b>	

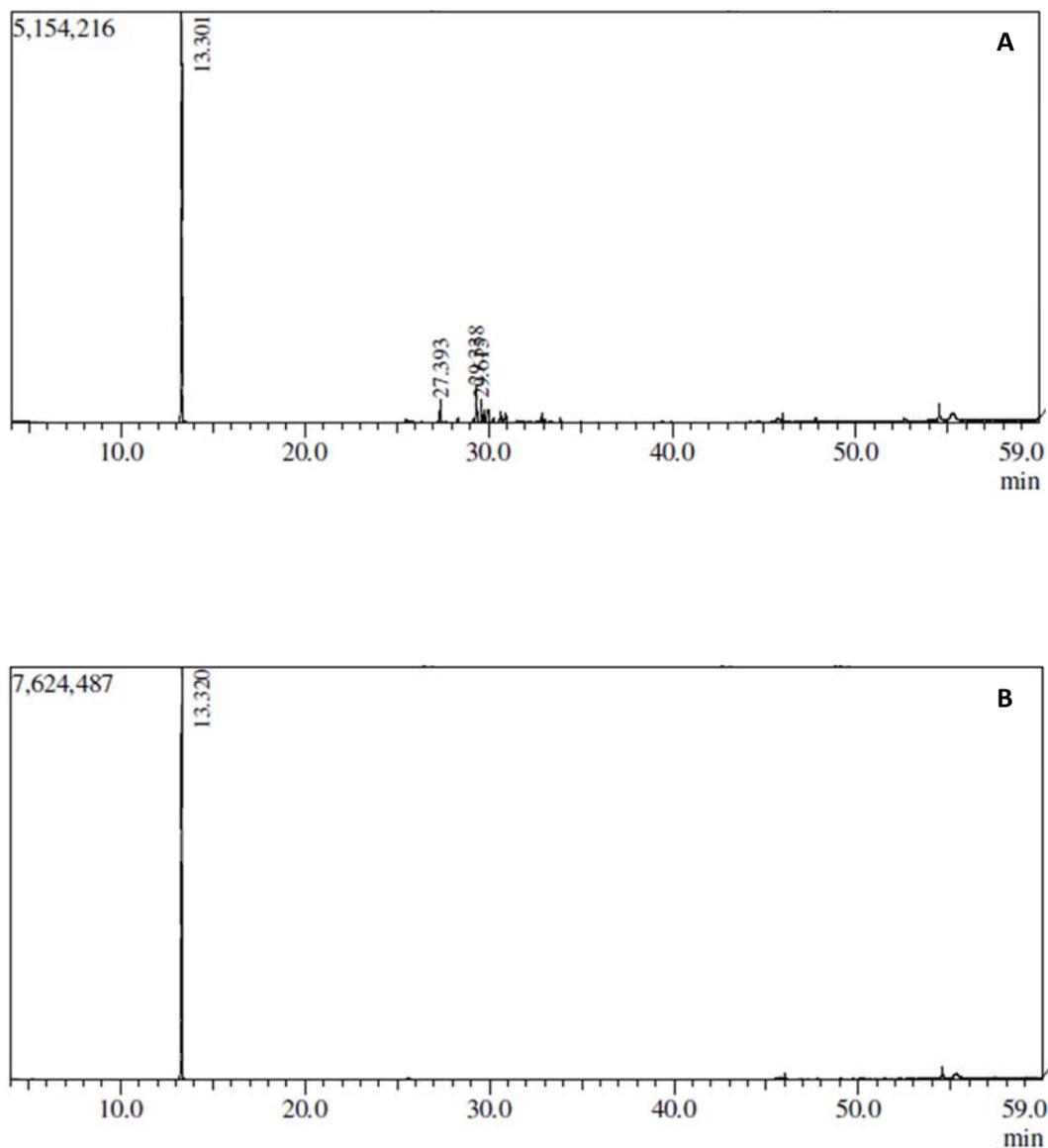
<sup>a</sup>formulação contendo óleo essencial; <sup>b</sup>formulação base sem óleo essencial.

Uma parte da massa das frações orgânicas obtidas foi reservada para o ensaio de atividade antimicrobiana, enquanto outra parte foi submetida à análise química por CG-EM, a fim de detectar a presença ou não do óleo essencial.

Nas Figuras 21 e 22 (páginas 54 e 55) estão apresentados os cromatogramas obtidos para as frações acetato de etila e hexânica, respectivamente, enquanto nas Tabelas 11 a 14 (página 56) estão apresentados os constituintes químicos identificados em cada fração orgânica.



**Figura 21.** Cromatogramas das frações acetato obtidas por partição da (A) formulação de enxaguarório bucal contendo óleo essencial (B) formulação de enxaguarório bucal base (todos os componentes exceto óleo essencial), obtidos por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas.



**Figura 22.** Cromatogramas das frações hexânicas obtidas por partição da (A) formulação de enxaguarório bucal contendo óleo essencial (B) formulação de enxaguarório bucal base (todos os componentes exceto óleo essencial), obtidos por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas.

**Tabela 11.** Substâncias identificadas na fração acetato de etila obtida por partição líquido-líquido da formulação do enxaguatório contendo óleo essencial.

Pico	Tempo de retenção (min)	Composto identificado	Porcentagem relativa	IS	IK	IK literatura
1	13,3	mentol	74,2	98	1178	1173
2	25,3	metilparabeno	25,8	98	1463	1465

1 é monoterpeno; 2 é não terpenóide.

**Tabela 12.** Substâncias identificadas na fração acetato de etila obtida por partição líquido-líquido da formulação do enxaguatório base sem óleo essencial.

Pico	Tempo de retenção (min)	Composto identificado	Porcentagem relativa	IS	IK	IK literatura
1	13,3	mentol	31,93	97	1177	1173
2	25,4	metilparabeno	68,07	97	1464	1465

1 é monoterpeno; 2 é não terpenóide.

**Tabela 13.** Substâncias identificadas na fração hexânica obtida por partição líquido-líquido da formulação do enxaguatório contendo óleo essencial.

Pico	Tempo de retenção (min)	Composto identificado	Porcentagem relativa	IS	IK	IK literatura
1	13,3	mentol	82,31	97	1177	1173
2	27,4	teresantalol	4,83	89	1514	
3	29,3	palustrol	8,14	95	1564	1568
4	29,6	espatulenol	4,72	94	1571	1576

1 e 2 são monoterpenos; 3 e 4 são sesquiterpenos.

**Tabela 14.** Substâncias identificadas na fração hexânica obtida por partição líquido-líquido da formulação do enxaguatório base sem óleo essencial.

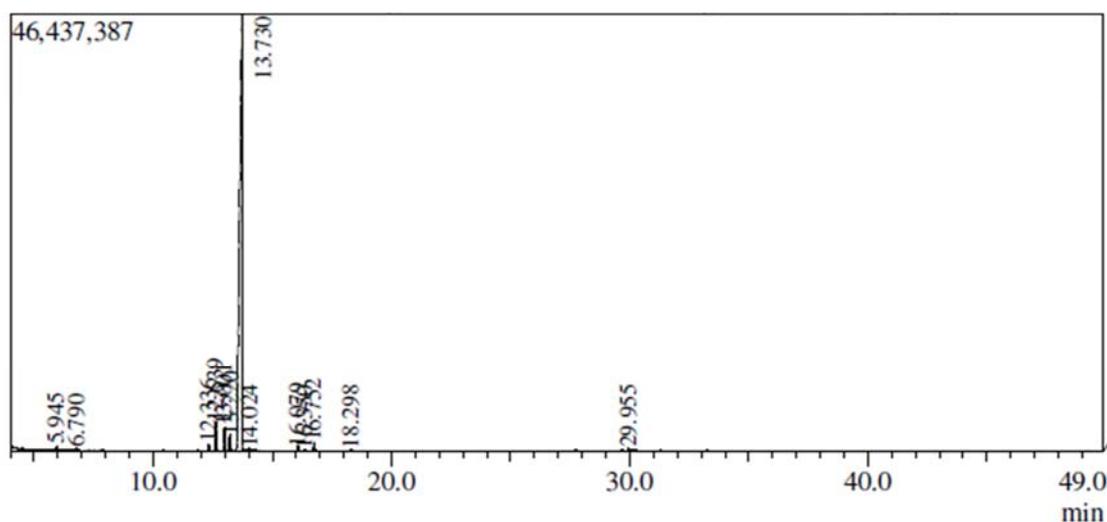
Pico	Tempo de retenção (min)	Composto identificado	Porcentagem Relativa	IS	IK	IK literatura
1	13,3	mentol	100	97	1178	1173

1 é monoterpeno.

#### 4.8.2. Hidrodestilação do enxaguatório bucal contendo óleo essencial e caracterização química da fração hidrodestilada

Um volume de 10 mL de enxaguatório contendo 10 mg de óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* foi submetido ao processo de hidrodestilação. Foram coletados os primeiros 60 mL de amostra condensada em aparelho Clevenger, uma vez que não houve separação aparente de fase aquosa e oleosa. Esta amostra foi submetida à partição com 20 mL de n-hexano para retirada seletiva dos componentes apolares e, após a concentração do volume, procedeu-se a caracterização química por CG-EM. Foi injetado separadamente no cromatógrafo a mesma quantidade de uma solução padrão 1 mg/mL de óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* preparada em n-hexano, a fim de comparar qualitativa e quantitativamente a presença dos componentes do óleo na formulação.

Na Figura 23 é possível observar o cromatograma obtido por CG-EM da amostra hidrodestilada, enquanto os constituintes químicos identificados estão apresentados na Tabela 15 (página 58).



**Figura 23.** Cromatograma da amostra hidrodestilada de enxaguatório bucal contendo 1 mg/mL de óleo essencial das inflorescências de *Aldama arenaria*, obtido por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas.

**Tabela 15.** Substâncias identificadas na amostra hidrodestilada da formulação de enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria*.

Pico	Tempo de retenção (min)	Composto identificado	Porcentagem relativa	IS	IK	IK literatura
1	5,945	5-ethyl-2-heptanone	0,22	85	963	-
2	6,790	6-nonenal	0,21	89	996	-
3	12,34	isopulegol	0,61	96	1147	1146
4	12,64	p-mentona	4,50	97	1155	1154
5	13,22	neomentol	1,52	97	1169	1164
6	13,73	mentol	91,08	98	1181	1173
7	14,02	isomentol	0,23	94	1188	1182
8	16,08	pulegona	0,34	95	1237	1237
9	16,35	carvona	0,14	95	1243	1243
10	16,75	piperitona	0,73	98	1253	1252
11	18,30	mentil acetato	0,15	95	1289	1294
12	29,96	espatulenol	0,26	95	1596	1576

1 a 11 são monoterpenos ou não terpenóides; 12 é sesquiterpeno.

#### 4.9. Avaliação da atividade antimicrobiana do enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* e de suas frações obtidas por partição líquido-líquido

O efeito antibacteriano do enxaguatório bucal e suas frações orgânicas frente *S. mutans* foi avaliado através do método da microdiluição em caldo.

O enxaguatório bucal contendo óleo essencial foi testado na faixa de concentrações de 0,78 a 400 µg/mL, obtidas por diluição seriada, levando-se em consideração a concentração de óleo essencial presente. As mesmas diluições foram feitas para o enxaguatório base, formulação a qual continha todos os componentes do enxaguatório exceto o óleo essencial. As frações hexânica e acetato de etila foram preparadas em DMSO na mesma faixa de concentrações testadas para o enxaguatório, no entanto, levando-se em consideração a concentração de óleo essencial supostamente extraída no processo de partição. As mesmas diluições foram realizadas para as frações hexânica e acetato de etila da formulação base. O controle positivo dicloridrato de clorexidina foi testado nas concentrações de 0,01 a 5,9 µg/mL. Os resultados destes ensaios estão apresentados na Tabela 16 (página 59).

**Tabela 16.** Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do enxaguatório bucal, suas frações orgânicas obtidas por partição líquido-líquido e do controle dicloridrato de clorexidina, para o micro-organismo *S. mutans*.

Amostra	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	CBM ( $\mu\text{g/mL}$ )
Enxaguatório contendo óleo essencial (EOE)	200	400
Enxaguatório base sem óleo essencial (EB)	200	400
Fração acetato EOE	-	-
Fração acetato EB	-	-
Fração hexânica EOE	100	100
Fração hexânica EB	-	-
Dicloridrato de clorexidina	1,4	1,4

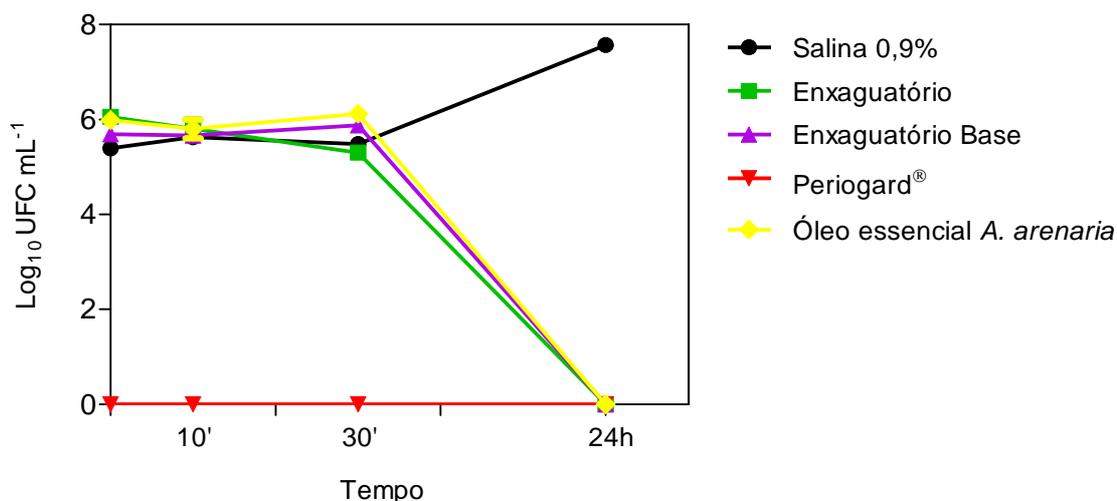
- : valores de CIM ou CBM acima de 400  $\mu\text{g/mL}$ .

As frações acetato de etila das formulações com e sem óleo essencial não apresentaram atividade inibitória nas condições testadas. A fração hexânica do enxaguatório contendo óleo essencial apresentou CIM de 100  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto a fração hexânica do enxaguatório base não apresentou atividade nessas condições. A CIM determinada para o enxaguatório bucal contendo óleo essencial foi 200  $\mu\text{g/mL}$ , mesmo valor apresentado para o enxaguatório base.

#### 4.10. Determinação do tempo de morte celular em culturas de *S. mutans* tratadas com o enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria*

O ensaio para determinação do tempo de morte celular foi realizado com a finalidade de estabelecer o tempo mínimo em que o enxaguatório bucal e o óleo essencial de *A. arenaria*, em suas concentrações bactericidas mínimas de 100 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, provocam uma redução de 99,9% na população de *S. mutans*, partindo-se de um inóculo original com cerca de  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Foram realizados controles com a formulação base do enxaguatório bucal (todos os componentes exceto óleo essencial) e o enxaguatório Periogard<sup>®</sup>, contendo digluconato de clorexidina 480  $\mu\text{g/mL}$  (concentração final). O controle negativo consistiu em células bacterianas tratadas apenas com solução salina 0,9%.

As curvas construídas a partir dos valores de  $\log_{10}\text{UFC}_x\text{mL}^{-1}$  pelo tempo de incubação (0 min, 10 min, 30 min e 24 h) para cada amostra estão apresentadas na Figura 24 (página 60).

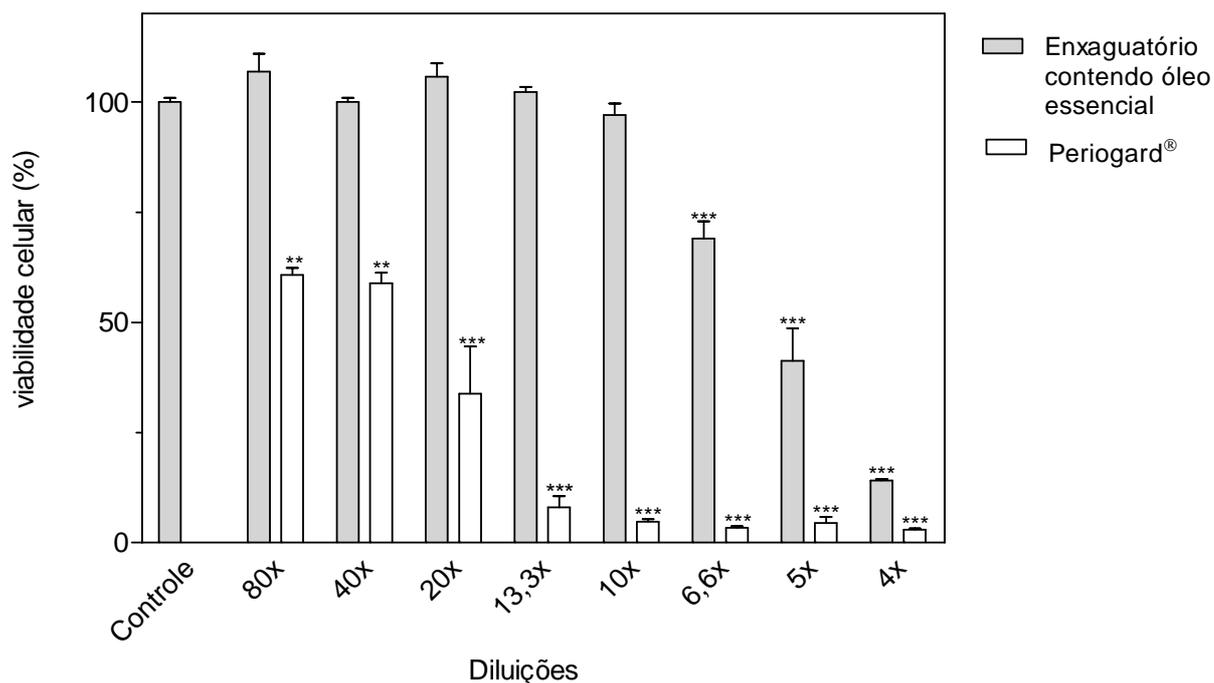


**Figura 24.** Efeitos sobre a viabilidade de *S. mutans* após 0 min, 10 min, 30 min e 24 h de incubação com diferentes amostras. Os valores representam a média±SEM (n = 3).

Dentre as amostras analisadas, o enxaguatório Periogard® foi o único que apresentou efeito bactericida a partir do tempo zero de incubação, não se observando crescimento celular até o período de 24 h. Culturas incubadas com o enxaguatório bucal contendo óleo essencial, enxaguatório base e óleo essencial isolado não promoveram morte celular em um período de até 30 min, apresentando seus efeitos bactericidas após 24 h de contato com os microorganismos.

#### 4.11. Avaliação da citotoxicidade do enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria*

Foram avaliados os efeitos sobre a viabilidade de fibroblastos gengivais humanos após 30 min de exposição ao enxaguatório bucal contendo óleo essencial e ao enxaguatório referência Periograd® contendo digluconato de clorexidina 0,12%. A viabilidade celular foi medida e expressa em termos da absorvância relativa das células tratadas com os enxaguatórios em comparação às células do grupo controle (tratadas apenas com meio de cultura). Os resultados estão apresentados na Figura 25 (página 61).



**Figura 25.** Efeitos sobre a viabilidade de fibroblastos gengivais humanos após 30 min de incubação com diluições seriadas de enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* e Periogard®, avaliados pelo método MTT. Os valores representam a média±SEM (n = 3).

\*\*p<0,001 e \*\*\*p<0,0001 quando comparados ao grupo controle (não tratado). One-way ANOVA, teste de Dunnett.

O enxaguatório contendo óleo essencial e o enxaguatório Periogard® foram testados sob as mesmas condições experimentais e nas mesmas diluições (4 a 80 vezes diluídos). Ambos demonstraram um efeito dose-resposta sobre a viabilidade, no entanto, Periogard® interferiu na proliferação das células em diluições maiores, ou seja, concentrações menores. Enquanto o enxaguatório contendo óleo essencial na diluição 10 vezes apresentou aproximadamente 100% de viabilidade celular, Periogard® reduziu a viabilidade para aproximadamente 5%, demonstrando-se muito mais citotóxico do que a microemulsão. O enxaguatório bucal provocou reduções na viabilidade dos fibroblastos apenas em diluições iguais ou acima de 6,6 vezes, a qual ainda permitiu aproximadamente 68% do crescimento celular.

#### 4.12. Efeito da formulação de enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* sobre a formação do biofilme de *S. mutans*

##### 4.12.1. Viabilidade bacteriana do biofilme

Para o ensaio do biofilme, optou-se por testar diretamente o óleo essencial isolado, ao invés da formulação, devido a problemas discutidos nas seções 5.8 e 5.9 do presente trabalho.

Assim, biofilmes de *S. mutans* formados na superfície de dentes bovinos simulando o episódio “miséria-fartura”, foram tratados com o óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* nas concentrações 250 e 1.000 µg/mL. O controle negativo foi tratado apenas com solução salina 0,9%, enquanto o controle positivo foi tratado com digluconato de clorexidina 0,12% (concentração final). A análise microbiológica se deu através da contagem do número de colônias viáveis após o tratamento do biofilme com as amostras. Os resultados estão apresentados na Tabela 17.

**Tabela 17.** Análise microbiológica dos biofilmes de *S. mutans* formados em dentes bovinos após exposição a diferentes tratamentos.

Amostra	N° de colônias* (UFC mL <sup>-1</sup> )
NaCl 0,9%	2,27 x 10 <sup>8</sup> ± 0,120
DMSO 1%	0,73 x 10 <sup>8</sup> ± 0,167
OE <sup>a</sup> 250 µg/mL	3,00 x 10 <sup>8</sup> ± 0,592
OE <sup>a</sup> 1.000 µg/mL	3,80 x 10 <sup>8</sup> ± 0,126
DCHX <sup>b</sup> 0,12%	0 ± 0

\*Os valores representam a média±SEM (n = 3)

<sup>a</sup>óleo essencial; <sup>b</sup>digluconato de clorexidina

O número total de UFC dos biofilmes tratados com o óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* nas concentrações 250 e 1.000 µg/mL e o solvente DMSO 1% (concentração final utilizada para dissolver os óleos) não diferiram significativamente da microbiota total do biofilme tratado com NaCl 0,9% (p>0,05). O digluconato de clorexidina 0,12% foi o único tratamento efetivo na eliminação do biofilme bacteriano, não sendo detectada nenhuma colônia viável nas placas de ágar.

#### 4.12.2. Determinação de polissacarídeos

Polissacarídeos são considerados fatores de virulência bacterianos e por isto os polissacarídeos extracelulares insolúveis (PECi), solúveis (PECs) e os polissacarídeos intracelulares (PIC) foram extraídos e determinados neste estudo.

Na Tabela 18 encontram-se os valores de carboidratos totais dos biofilmes tratados com diferentes amostras, obtidos pelo método do fenol-sulfúrico.

**Tabela 18.** Concentrações de polissacarídeos extracelulares solúveis e insolúveis e polissacarídeos intracelulares dos biofilmes de *S. mutans* formados em dentes bovinos após diferentes tratamentos.

Tratamentos	Polissacarídeos Extracelulares (PEC)		Polissacarídeos
	Solúveis (PECs)	Insolúveis (PECi)	Intracelulares (PIC)
NaCl 0,9%	126,9 ± 15,8	1850,4 ± 293,1	363,3 ± 47,7
DMSO 1%	155,5 ± 39,9	1186,6 ± 219,9	278,9 ± 24,4
OE <sup>a</sup> 250 µg/mL	84,2 ± 21,2	1453,9 ± 20,2	241,8 ± 21,5*
OE <sup>a</sup> 1.000 µg/mL	102,7 ± 10,7	1643,6 ± 91,45	239,6 ± 6,9*
DCHX <sup>b</sup> 0,12%	19,8 ± 1,6	169,9 ± 110,1***	68,0 ± 9,4***

Concentração (µg/mL) ± SEM (n=3)

<sup>a</sup>óleo essencial; <sup>b</sup>digluconato de clorexidina

\*\*\*p<0,0008 e \*p<0,05 quando comparado ao grupo controle NaCl 0,9%. *One-way* ANOVA, teste de Dunnett.

Para todas as amostras, os polissacarídeos extracelulares insolúveis representaram a maior parte da composição dos carboidratos sintetizados pelos biofilmes, seguidos dos polissacarídeos intracelulares. Os polissacarídeos extracelulares solúveis encontraram-se em menor quantidade e, neste mesmo grupo, não houve diferenças significativas entre as concentrações determinadas para todos os tratamentos. O biofilme tratado com digluconato de clorexidina 0,12% foi o único que apresentou redução significativa (p<0,05) na síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis, quando comparado ao controle negativo NaCl 0,9%. O óleo essencial afetou apenas a síntese de polissacarídeos intracelulares, sendo observada uma diminuição significativa (p<0,05) nos biofilmes tratados com as concentrações de 250 e 1.000 µg/mL.

#### 4.12.3. Determinação do pH do biofilme bacteriano

Os valores de pH dos meios de cultura foram monitorados ao fim de cada 24 h, durante 5 dias de incubação e tratamentos dos biofilmes. Na Tabela 19 (página 64) estão apresentadas

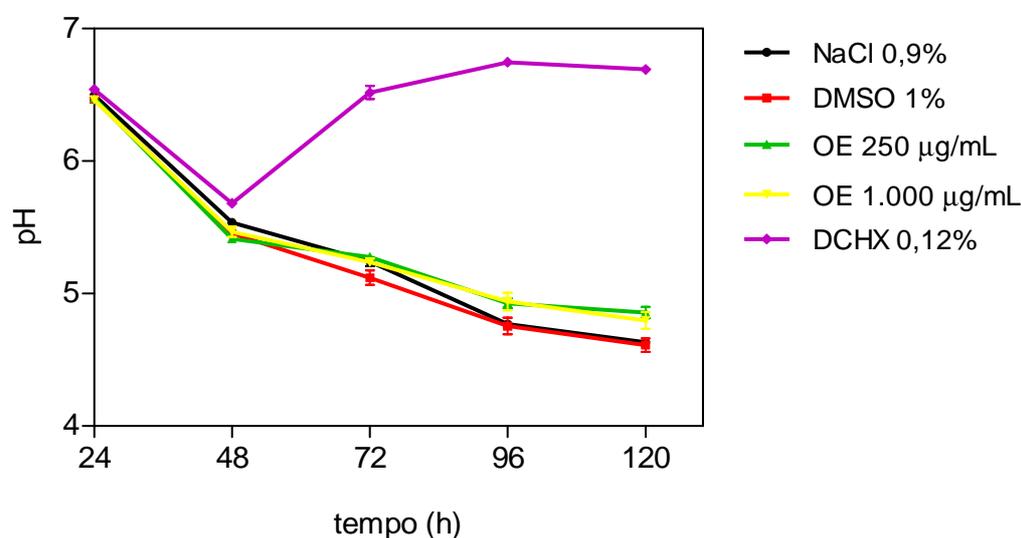
as médias dos valores obtidos ao longo dos dias de tratamento para cada amostra, enquanto as respectivas curvas de queda do pH estão apresentadas na Figura 26.

**Tabela 19.** Medidas de pH do meio de cultura durante a incubação de biofilmes de *S. mutans* com diferentes tratamentos.

<i>Tempo</i> (h)	<i>pH DCHX<sup>b</sup></i> 0,12%	<i>pH NaCl</i> 0,9%	<i>pH DMSO</i> 1%	<i>pH OE<sup>a</sup></i> 250 µg/mL	<i>pH OE<sup>a</sup></i> 1.000 µg/mL
24	6,54 ± 0,026	6,49 ± 0,012	6,46 ± 0,007	6,47 ± 0,013	6,46 ± 0,000
48	5,68 ± 0,017	5,53 ± 0,015	5,45 ± 0,026	5,41 ± 0,015	5,46 ± 0,041
72	6,56 ± 0,005	5,24 ± 0,031	5,12 ± 0,053	5,27 ± 0,017	5,23 ± 0,029
96	6,74 ± 0,018	4,77 ± 0,015	4,75 ± 0,062	4,92 ± 0,038	4,94 ± 0,067
120	6,69 ± 0,006	4,63 ± 0,010	4,61 ± 0,050	4,85 ± 0,043	4,79 ± 0,064

Os valores representam a média±SEM (n = 3)

<sup>a</sup>óleo essencial; <sup>b</sup>digluconato de clorexidina



**Figura 26.** Curvas das medidas do pH do meio de cultura durante a incubação de biofilmes de *S. mutans* com diferentes amostras. O meio de cultura foi substituído diariamente. Os valores de pH (n=3) foram determinados após 24, 48, 72, 96 e 120 h de incubação.

O tempo de 24 h representa o pH do meio de cultura antes do tratamento com sacarose. Após a verificação do pH, os biofilmes foram tratados com sacarose 10% para seu

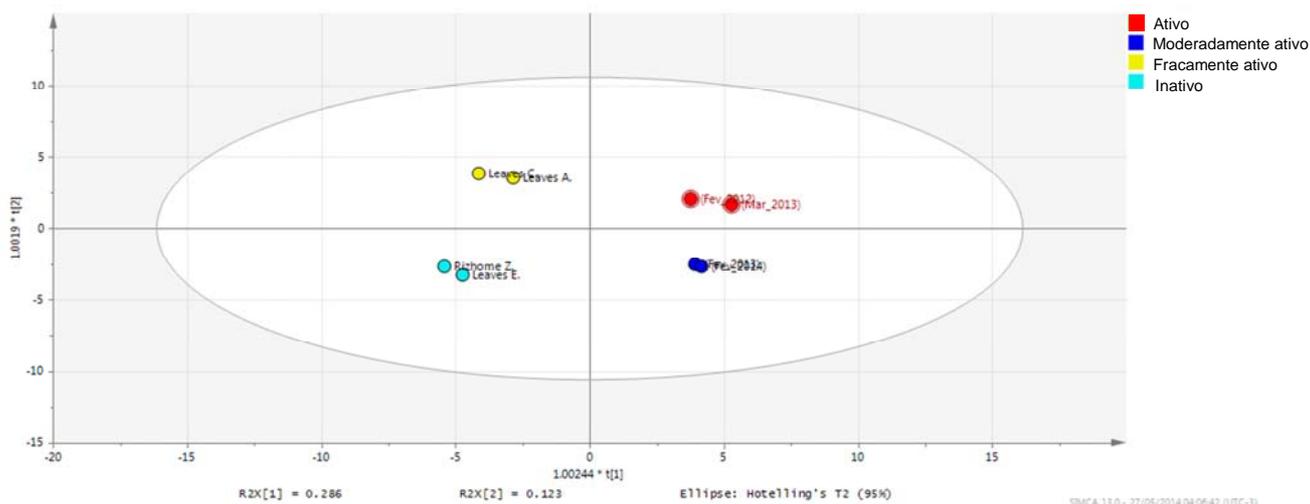
crescimento sobre a superfície dos blocos dentais bovinos. Assim, a medida do tempo 48 h representa o pH do meio de cultura após a primeira exposição ao substrato. Foi observada uma redução do pH de aproximadamente 6,48 para 5,50 em todos os tratamentos, decorrente da metabolização do carboidrato fermentável por *S. mutans*.

A partir do segundo dia, os biofilmes foram expostos periodicamente aos tratamentos com sacarose e também às amostras. Como apresentado na Figura 26 (página 64), apenas o tratamento com digluconato de clorexidina 0,12% foi capaz de suprimir a produção de ácidos do biofilme logo após o primeiro dia de exposição à amostra, recuperando o valor do pH original no tempo de 72 h. Ocorreu uma queda gradativa nos valores de pH dos meios dos biofilmes tratados com solução salina 0,9%, DMSO 1% e com os óleos essenciais, observando-se uma queda significativa ( $p < 0,05$ ) a partir de 72 h em relação ao pH do primeiro dia.

#### **4.13. Aplicação de método estatístico multivariado aos dados químicos (OPLS-DA)**

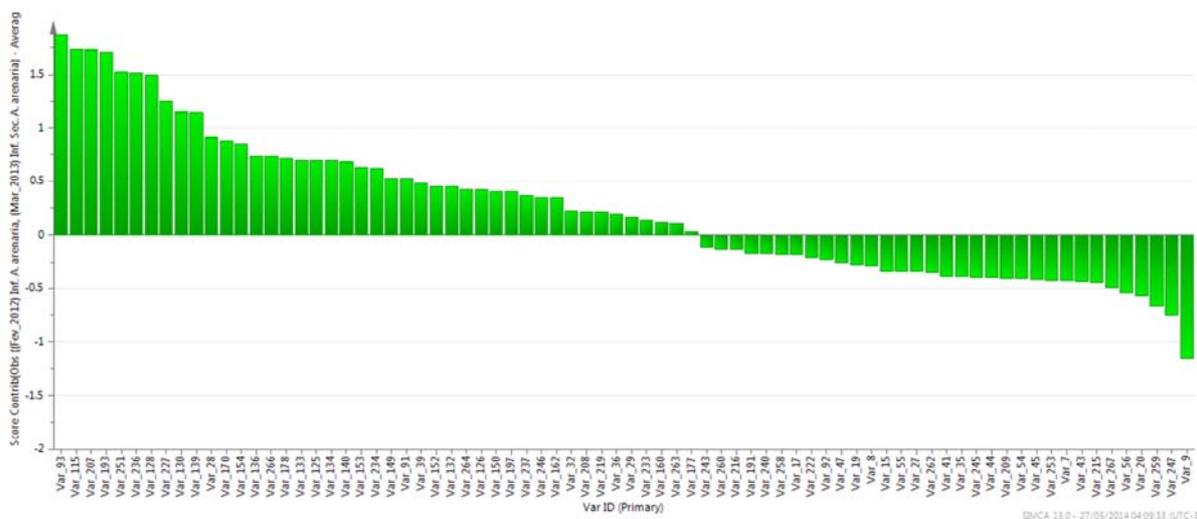
Os dados químicos dos óleos essenciais foram correlacionados com a atividade antimicrobiana por meio de análises supervisionadas, sendo aqui representado o *Orthogonal Partial Least Squares - Discriminant Analysis* (OPLS-DA<sup>TM</sup>; SIMCA, Umetrics, Suécia). Este modelo é um método de classificação supervisionada recomendado para casos de classe ou múltiplas classes (TRYGG; HOLMES; LUNDSTEDT, 2007) e é capaz de realizar uma separação das variações da matriz X (matriz de variáveis independentes) em duas partes, uma linearmente relacionada à matriz resposta Y e outra que é ortogonal à Y. A variação preditiva de Y em X é modelada pelas variáveis preditivas. A variação em X que é ortogonal à Y é modelada pelas variáveis ortogonais.

Assim sendo, podemos observar por meio do OPLS-DA, uma alta separação ( $R^2 = 0.99$ ) das diferentes classes (atividades) de óleos, de acordo com a composição química de cada classe, como observado na Figura 27 (página 66).



**Figura 27.** Gráfico de dispersão (OPLS-DA) das espécies vegetais analisadas.

Com base no gráfico de dispersão obtido, foram identificados os componentes químicos que estariam correlacionados com a atividade antimicrobiana. Isso foi dado pela determinação das variáveis altamente correlacionadas com a resposta observada e significância estatística determinada pelo *software*. Deste modo, ao selecionar as amostras de óleos essenciais que obtiveram maior atividade (“ativo”, apresentados em vermelho na Figura 27) pudemos visualizar aquelas variáveis altamente correlacionadas com esta específica resposta, como demonstrado na Figura 28.



**Figura 28.** Gráfico de variáveis importantes\* na projeção (OPLS-DA) dos constituintes químicos das espécies vegetais analisadas.

\*variáveis altamente correlacionadas com a resposta “ativo”

A partir do gráfico de variáveis altamente correlacionadas, foi gerada uma lista contendo a descrição dessas variáveis pelo *software*, conforme apresentado na Tabela 20.

**Tabela 20.** Componentes químicos dos óleos essenciais das espécies analisadas correlacionados com a resposta “ativo” na projeção (OPLS-DA).

Variável	Componente químico
Var_93	ni 11*
Var_115	ni 13*
Var_207	ácido palmítico*
Var_193	ni 8*
Var_251	$\beta$ -bisaboleno
Var_236	$\alpha$ -cariofileno
Var_128	ni 17*
Var_227	<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoteno
Var_130	ni 19
Var_139	ni 27*
Var_28	carotol
Var_170	ni 6
Var_154	ni 42*
Var_136	ni 24

\*correlação positiva com a resposta “ativo”  
ni = não identificado

Em termos estatísticos, todas as substâncias apresentadas na tabela seriam responsáveis pela atividade antimicrobiana, como carotol, *trans*- $\alpha$ -bergamoteno,  $\alpha$ -cariofileno,  $\beta$ -bisaboleno, entre outros componentes não identificados (ni). No entanto, as variáveis assinaladas estão positivamente correlacionadas com a resposta classificada como “ativo” e apresentam maior significância estatística (menor variação quando preditas por uma validação interna). O ácido palmítico demonstrou-se uma variável de maior importância junto com outros componentes não identificados.

*Discussão*

## 5. Discussão

### 5.1. Obtenção dos óleos essenciais

Os maiores rendimentos de extração dos óleos essenciais foram obtidos a partir das plantas secas. A espécie *I. verum* apresentou o maior rendimento (5,33%), o qual foi superior ao rendimento encontrado na literatura de 3,81% (LIMA et al., 2014). Tal fato pode ser explicado devido a diferença no tempo de extração empregado, sendo adotado 4 h de extração neste trabalho e 2,5 h na literatura citada. O segundo maior rendimento obtido foi o das folhas secas de *E. globulus* (3,56%), o qual também foi superior aos rendimentos encontrados na literatura de 0,7 a 2,4% (VITTI; BRITO, 2003). No entanto, esses rendimentos foram baseados no peso das folhas frescas.

O rendimento obtido para *C. citratus* (1,30%) demonstrou-se menor do que o rendimento obtido na literatura de 2,12% (MOHAMED HANAA et al., 2012). Os rendimentos obtidos para os rizomas secos de *Z. officinale* (1,03%) e para as folhas frescas de *A. arenaria* (0,93%) foram maiores do que os encontrados na literatura de 0,71% e 0,23%, respectivamente (FERNANDES, 2011; OLIVEIRA, 2011).

Moronkola e colaboradores, 2007, obtiveram rendimentos para as folhas e inflorescências secas de *T. diversifolia* iguais a 0,019 e 0,1%, respectivamente. Os rendimentos obtidos neste trabalho para os mesmos órgãos frescos foram de 0,27% para as folhas e 0,08% para as inflorescências. Alguns fatores que podem influenciar o acúmulo de óleo essencial nos órgãos vegetais são fatores genéticos e ambientais, tais como temperatura, intensidade de luz e efeito sazonal (GOBBO-NETO; LOPES, 2007), o que poderia explicar as diferenças em alguns rendimentos obtidos neste trabalho com os rendimentos encontrados na literatura.

De forma geral, os menores rendimentos foram os das inflorescências frescas de *T. diversifolia* (0,08%) e *A. arenaria* (0,04%). O fato do rendimento do óleo essencial das inflorescências das espécies coletadas ter sido inferior ao rendimento das folhas pode estar relacionado à quantidade de estruturas secretoras presentes nesses órgãos. Porém, há estudos que afirmam que a biossíntese de óleos essenciais deve estar mais relacionada com a atividade bioquímica das estruturas secretoras do que com a frequência destas (DESCHAMPS et al., 2008). Assim, essa variação obtida pode estar relacionada às diferentes pressões ambientais às quais cada órgão está submetido, além do aparato bioquímico e fisiológico de cada um, refletindo na biossíntese e composição do óleo essencial (OLIVEIRA, 2011).

A extração de óleo essencial a partir das inflorescências de *A. arenaria* secas à sombra levou a obtenção de um rendimento duas vezes maior (0,08%) do que o obtido para as

inflorescências frescas da mesma espécie (0,04%). Um estudo utilizando folhas frescas e secas de *C. citratus* analisou a interferência de diferentes processos de secagem no rendimento das extrações de óleo essencial (MOHAMED HANAA et al., 2012). O maior rendimento apresentado foi obtido a partir de folhas secas em estufa a 45°C (2,34%), seguido pela secagem ao sol (2,10%) e a secagem à sombra com ventilação (2,12%), os quais não diferiram significativamente entre si. O rendimento obtido a partir de folhas frescas, por sua vez, foi de apenas 0,67%, ou seja, mais de três vezes menor do que os rendimentos baseados no peso seco. Logo, fica claro que os processos de secagem podem levar a obtenção de maiores rendimentos, devido a utilização de matérias vegetais com menor teor de água no seu peso total. Vale ressaltar que os diferentes métodos de secagem não interferiram qualitativamente nos componentes majoritários, porém, promoveram uma mudança quantitativa, sendo que maiores porcentagens desses componentes foram detectadas no óleo essencial das folhas secas à sombra com ventilação.

## 5.2. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais

Com base em alguns critérios da literatura e nas concentrações inibitórias mínimas obtidas para os óleos essenciais estudados, foi possível classificar o óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* ativo frente a *S. mutans* e *S. mitis* e moderadamente ativo contra *S. salivarius* e *L. casei*. Todos os óleos essenciais apresentaram-se inativos contra *E. faecalis* e *S. sanguis*, linhagens que se demonstraram mais resistentes à ação desses óleos.

Os óleos essenciais das folhas de *A. arenaria* e das inflorescências de *T. diversifolia* foram considerados moderadamente ativos frente à *S. mitis* e *S. mutans*.

## 5.3. Efeito dos óleos essenciais sobre o potencial acidogênico de *S. mutans in vitro*

O efeito dos óleos essenciais na produção glicolítica de ácidos foi avaliado durante 30 min de incubação. Todos os óleos essenciais analisados apresentaram um efeito dose-resposta na inibição da produção de ácidos por *S. mutans*.

As curvas hiperbólicas ou sigmoidais são características da relação ideal entre a concentração de uma droga e a magnitude de sua resposta (0 a 100% de efeito), quando plotada em escala linear (LEITÃO, 2005). Esse perfil hiperbólico pode ser observado nas curvas dose-resposta traçadas para todos os óleos essenciais. Apesar das curvas dos óleos essenciais dos frutos de *I. verum*, das folhas de *C. citratus* e das folhas de *A. arenaria* não apresentarem um *plateau* correspondentes aos seus efeitos máximos nas concentrações testadas, suas relações dose-efeito ainda tendem a um comportamento hiperbólico.

Os óleos essenciais com melhor atividade inibitória para a produção de ácidos bacterianos foram os das inflorescências de *A. arenaria* e *T. diversifolia*, apresentando  $CI_{50}$  iguais a 26,5 e 30  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. O poder de inibição do primeiro pode estar relacionado à sua atividade bacteriostática determinada em 15,63  $\mu\text{g/mL}$  para *S. mutans*. O óleo essencial de *T. diversifolia*, por sua vez, apresentou atividade inibitória significativa de ácidos em concentração 10 vezes menor (25  $\mu\text{g/mL}$ ) do que a concentração inibitória mínima determinada para o crescimento de *S. mutans* (250  $\mu\text{g/mL}$ ). A partir dessa observação, podemos inferir que o efeito inibitório na produção de ácidos se deve provavelmente a um efeito direto na via glicolítica bacteriana, e não devido à atividade anti-proliferativa do óleo essencial das inflorescências de *T. diversifolia*.

A redução significativa de ácidos em concentrações que se demonstraram inativas contra o crescimento *in vitro* de *S. mutans* também foi observada para os demais óleos essenciais testados, indicando que estes óleos também apresentaram efeitos diretos na via glicolítica.

#### 5.4. Seleção do óleo essencial

O óleo essencial com resultados mais promissores obtidos nos ensaios de atividade antimicrobiana com micro-organismos bucais e no ensaio do potencial acidogênico de *S. mutans* foi o óleo essencial das inflorescências de *Aldama arenaria*.

Essa espécie vegetal é pertencente à família Asteraceae e apresenta-se como ervas cespitosas a subarbustos de desenvolvimento sazonal (OLIVEIRA, 2011). Seus representantes concentram-se principalmente no centro-leste no estado de São Paulo, com poucas ocorrências no sudoeste de Minas Gerais, ocorrendo em áreas degradadas de cerrado e beiras de estradas (MAGENTA, 2006).

A espécie *A. arenaria* era classificada como pertencente ao gênero *Viguiera*, no entanto, recentemente, através de análise molecular, as espécies sul-americanas desse gênero foram transferidas ao gênero *Aldama* (SCHILLING; PANERO, 2011).

Algumas atividades farmacológicas descritas para *A. arenaria* são antichagásica, vasodilatadora, antimicrobiana e antitumoral (PORTO et al., 2009; AMBROSIO; SCHORR; DA COSTA, 2004).

Não foram encontradas na literatura informações sobre o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *A. arenaria* frente a micro-organismos bucais, no entanto, seus extratos e diterpenos isolados foram efetivos na inibição do crescimento de micro-organismos causadores de infecções endodônticas (CARVALHO, 2009).

### 5.5. Análise fitoquímica do óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria*

O óleo essencial obtido das inflorescências coletadas em fevereiro de 2012 apresentou-se como uma mistura complexa de 56 substâncias, sendo a maioria delas sesquiterpenos oxigenados (aproximadamente 39% da composição total), seguido pela classe dos sesquiterpenos hidrocarbônicos (aproximadamente 12%). Os monoterpenos hidrocarbônicos foram encontrados em pequenas quantidades (aproximadamente 4%), sendo o limoneno o principal constituinte da classe (2,41%). O óleo não apresentou monoterpenos oxigenados. Aproximadamente 43% da composição total não pode ser identificada com base nos espectros de massas e índice de Kovats (IK) dos componentes. A partir das áreas relativas de cada pico dos cromatogramas, carotol foi identificado como constituinte majoritário, correspondendo a 12,67% da composição do óleo essencial. Um dos componentes majoritários não pode ser identificado (12,09%), enquanto falcarinol (6,71%) e espatulenol (5,48%) também foram identificados como constituintes majoritários.

O óleo essencial obtido das inflorescências coletadas em fevereiro de 2013 apresentou 60 substâncias, sendo a maioria delas sesquiterpenos oxigenados (43,26%), seguido pelos monoterpenos hidrocarbônicos (20,28%) e sesquiterpenos hidrocarbônicos (11,28%). O componente 4-terpineol foi o único monoterpeno oxigenado encontrado, no entanto, em concentração muito baixa. O limoneno foi o maior representante dos monoterpenos e também identificado como um dos componentes majoritários (11,76%), juntamente com os componentes palustrol (25,13%) e teresantalol (5,13%). A proporção de componentes não identificados foi de 25%.

O óleo essencial obtido das inflorescências coletadas em fevereiro de 2014, por sua vez, apresentou 51 substâncias, sendo composto majoritariamente por monoterpenos hidrocarbônicos (41,35%), seguidos pelos sesquiterpenos oxigenados (13,56%) e sesquiterpenos hidrocarbônicos (12,98%). O único monoterpeno oxigenado identificado foi o 4-terpineol, em concentração também muito baixa. Aproximadamente 32% das substâncias não puderam ser identificadas. O principal monoterpeno foi o limoneno (19,9%), que constituiu um dos componentes majoritários do óleo juntamente com  $\beta$ -mirceno (8,64%) e espatulenol (6,39%),

Logo, é possível observar uma grande diferença de composição dos óleos obtidos por diferentes coletas, variando-se, inclusive, a natureza dos componentes majoritários. Apenas o monoterpeno limoneno se manteve como majoritário no óleo essencial das coletas de 2013 e 2014, e, foi o principal monoterpeno da classe para o óleo da coleta de 2012. Além dos majoritários, a proporção de sesquiterpenos e monoterpenos também mostrou-se alterada,

sendo encontrada maior quantidade de monoterpenos para o óleo essencial de 2014 e maior quantidade de sesquiterpenos para os óleos de 2012 e 2013.

Um fator que pode afetar a produção de monoterpenos é a quantidade de luz, sendo que a baixa intensidade luminosa geralmente diminui sua produção (LIMA; KAPLAN; CRUZ, 2003). Pequenas variações diárias estimulam a produção de terpenóides, enquanto intensidades extremas causam reduções em sua síntese.

Segundo Gobbo-Neto e Lopes, 2007, a época em que uma planta é coletada é um dos fatores mais importantes a serem considerados, uma vez que a natureza dos constituintes ativos varia ao longo do ano, e, assim, a quantidade e até mesmo a natureza dos constituintes podem ser alteradas.

Apesar de todas as coletas terem sido realizadas no mês de fevereiro, as condições ambientais de cada ano podem não ter sido as mesmas, visto que o local de coleta dessas plantas foi em terrenos baldios na beira de uma rodovia. Assim, podem ter ocorrido inúmeras variações ambientais como diferentes incidências de luz solar, diferenças de temperatura, variações no solo e níveis de precipitação, ventos fortes, além das possíveis interferências humanas, como a promoção de queimadas esporádicas, fatores os quais podem influenciar diretamente na natureza e quantidade de metabólitos produzidos durante o desenvolvimento vegetal (VITTI; BRITO, 2003).

Em adição, mesmo que distribuídas em determinada região geográfica, populações naturais de plantas ainda apresentam variações quanto à constituição genética e a atividade fisiológica, e, embora pertencendo à mesma espécie, podem responder de modo muito diferente às condições ambientais (MARTINS et al., 2006).

Fatores como métodos de extração e horário da coleta também podem influenciar na obtenção dos constituintes químicos. No entanto, para todos os óleos essenciais foi utilizada a mesma técnica e tempo de extração e todas as coletas foram realizadas no período da manhã. Um fator que poderia explicar a reduzida quantidade de monoterpenos encontradas no óleo essencial das inflorescências coletadas em fevereiro de 2012, é que estas foram acondicionadas em sala refrigerada durante três dias antes do processo de extração. Assim, pode ter ocorrido a perda de monoterpenos nesse período, que são componentes mais voláteis do óleo essencial. As inflorescências coletadas em 2013 e 2014, por sua vez, foram armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante um dia até o processo de extração.

Não foram encontradas na literatura informações sobre estratégias de propagação de *A. arenaria*, as quais seriam importantes para o conhecimento das condições favoráveis ao cultivo e manejo desta espécie. O cultivo de plantas permite controlar alguns fatores como

variabilidade genética, variabilidade geográfica e tipo de solo, refletindo em uma menor variação do teor e composição química dos óleos essenciais (MARTINS et al., 2006).

Outra vantagem obtida com o cultivo é a possibilidade de controlar condições como a nutrição mineral e a disponibilidade hídrica, fatores os quais podem ser otimizados para a obtenção de maiores rendimentos de óleo essencial (MORAIS, 2009). Tais estratégias seriam interessantes, visto o baixo rendimento obtido para o óleo das inflorescências desta espécie (0,04%).

### **5.6. Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria***

Um problema muito comum na pesquisa de produtos naturais antimicrobianos é a falta de discriminação da toxicidade celular específica, o que leva a classificação equivocada de muitos extratos, óleos essenciais e componentes isolados como promissores antimicrobianos, enquanto, na verdade, são citotóxicos (COS et al., 2006). Assim, os ensaios de citotoxicidade desses produtos são de grande importância para validar a seletividade dessas substâncias.

Os resultados dos efeitos do óleo essencial sobre a proliferação de fibroblastos gengivais humanos *in vitro* foram avaliados após 30 min de exposição a concentrações seriadas do óleo.

O tempo de exposição de 30 min foi escolhido baseado nas recomendações de uso de enxaguatórios bucais por cirurgiões-dentistas, ou seja, aproximadamente 30 segundos de bochecho seguido por 30 min sem a ingestão de alimentos ou bebidas pelo usuário. Assim, as células da mucosa ficariam expostas ao produto por aproximadamente 30 min, segundo tais recomendações.

O óleo essencial selecionado demonstrou não afetar a viabilidade celular em concentrações até 250 µg/mL ( $p > 0,05$ ). Reduções significativas na proliferação foram detectadas em concentrações iguais ou acima de 300 µg/mL, a qual ainda permitiu aproximadamente 78% do crescimento celular.

Através da comparação dos resultados, podemos observar que a  $CI_{50}$  do óleo essencial responsável pela inibição de 50% da proliferação celular (450,6 µg/mL) é superior às concentrações que promovem significativas inibições na produção de ácidos por *S. mutans*. A concentração do óleo responsável pela inibição máxima de ácidos (125 µg/mL) atinge 76,28% de inibição e, como verificado no ensaio de proliferação, não é considerada citotóxica para os fibroblastos gengivais humanos.

Além disso, o óleo essencial apresentou atividade bactericida frente ao crescimento de *S. mutans*, *S. mitis*, *S. salivarius* e *L. casei* em concentrações que também não interferiram significativamente na viabilidade celular (62,5, 31,25, 250 e 125 µg/mL, respectivamente).

O solvente DMSO foi testado na concentração máxima utilizada para dissolver o óleo essencial (1% no volume final) e não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle (considerado como 100% de viabilidade celular).

O digluconato de clorexidina 0,12% (concentração comercialmente utilizada em enxaguatórios contendo esse princípio ativo) resultou em aproximadamente 90% de morte celular após 30 min de incubação, resultado estatisticamente não significativo quando comparado à inibição de aproximadamente 96% da proliferação celular promovida pelo grupo controle positivo dodecil sulfato de sódio 20%. Os mecanismos de citotoxicidade da clorexidina estão discutidos mais adiante, na seção 5.11.

## **5.7. Preparo e caracterização do enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria***

### **5.7.1. Formulação do enxaguatório bucal**

Segundo Van der Ouderaa, 1991, um agente antimicrobiano empregado em um enxaguatório bucal deve ser atóxico na concentração utilizada, não induzir alergias, ser de fácil manipulação e possuir eficácia e especificidade para a microbiota bucal. Além dos componentes ativos antimicrobianos, outras substâncias comumente utilizadas nos enxaguatórios são os tensoativos, espessantes, flavorizantes, edulcorantes, corantes e conservantes, em proporções que não apenas garantam segurança para consumo humano e uma boa estabilidade físico-química, mas também forneçam características organolépticas como cor, sabor e aspecto agradáveis à formulação. Assim, os componentes da microemulsão foram selecionados de forma a obter o sistema mais compatível possível com as propriedades descritas anteriormente. A composição final da formulação contendo óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* pode ser verificada na Tabela 8 (página 52).

Na microemulsão, o mentol foi utilizado como agente de refrescância. Dados da literatura demonstram que a associação do mentol ao salicilato de metila, timol e eucaliptol, pode apresentar ação antimicrobiana devido a um mecanismo de alteração da parede celular bacteriana (CIANCIO, 2004).

O metilparabeno e o benzoato de sódio foram escolhidos como conservantes da microemulsão por serem amplamente aceitos e utilizados em medicamentos, cosméticos e, o último conservante em especial, na indústria alimentícia. O metilparabeno é estável na

presença de mucilagens, gomas, gorduras, óleos e soluções aquosas, mantendo sua atividade antimicrobiana entre valores de pH de 4 a 8. As concentrações máximas de metilparabeno e benzoato de sódio permitidas pela legislação cosmética são, respectivamente, 0,4 e 0,5% (ANVISA, 2001). Uma vez que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária classifica os enxaguatório bucais como cosméticos de higiene pessoal, as concentrações de conservantes utilizadas na formulação se encontram dentro do limite permitido pela legislação.

O fluoreto de sódio foi utilizado como agente de prevenção da cárie dental. A maioria dos antissépticos bucais disponíveis no mercado apresenta uma associação dos agentes antimicrobianos com o fluoreto de sódio, como cloreto de cetilpiridínio e fluoreto de sódio; triclosan, copolímero PVM/MA e fluoreto de sódio; triclosan, copolímero PVM/MA, cloreto de cetilpiridínio e fluoreto de sódio; digluconato de clorexidina e fluoreto de sódio (ZANIN et al., 2007). Além disso, substâncias como o óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria*, capazes de inibir a produção de ácidos por micro-organismos bucais (vide Figura 11, página 41), podem ter seus efeitos anticariogênicos potencializados na presença de fluoreto (TRAHAN, 1995), uma vez que este interfere físico-quimicamente no desenvolvimento da cárie, reduzindo a desmineralização e aumentando a remineralização do esmalte dental (DAWES; TEN CATE, 1990).

A sacarina sódica foi utilizada como flavorizante do enxaguatório bucal, por ser um edulcorante não cariogênico altamente solúvel em água e fornecer um sabor agradável à formulação.

A presença de álcoois nas formulações enxaguatórias, especialmente o etanol, foi utilizada durante muito tempo, e ainda persiste, devido as vantagens em sua utilização como facilidade na dissolução de constituintes ativos, sensação de refrescância, preservação e atividade germicida (QUIRYNEN et al., 2005). Alguns exemplos de enxaguatórios disponíveis no mercado que possuem álcool em sua formulação são Listerine<sup>®</sup>, Plax<sup>®</sup>, Cepacol<sup>®</sup> e Periogard<sup>®</sup>. No entanto, devido aos efeitos negativos associados ao uso do álcool como maior citotoxicidade e irritação às células da mucosa oral, ressecamento, contraindicações ao uso em gestantes, lactantes, crianças e até mesmo ao aumento de efeitos genotóxicos nas células da mucosa (PITHON et al., 2011; MASCARENHAS, 2004), a maioria dessas marcas já disponibilizam no mercado formulações sem álcool. Assim, optamos por formular uma microemulsão isenta de etanol.

Para a incorporação da fase oleosa composta por óleo de canola e óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria*, foi utilizada uma mistura de tensoativos/cotensoativo composta por PEG 40, sorbitol e glicerol na proporção de 1:1:1 (LEITE et al., 2008). A

proporção de tensoativos/cotensoativo utilizada na formulação (19,86% da composição total) foi obtida a partir do diagrama de fases pseudo-ternário e foi escolhida visando propiciar a solubilização do óleo na fase aquosa, formando uma microemulsão aparentemente translúcida, com maior conteúdo aquoso (79,26% da composição total) e menor viscosidade.

A concentração de óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* escolhida para ser veiculada na formulação foi 250 µg/mL, uma vez que foi a maior concentração não citotóxica determinada e, ainda, é quatro vezes maior do que a concentração bactericida de 62,5 µg/mL determinada para *S. mutans* e aproximadamente nove vezes maior do que a  $CI_{50}$  de 26,5 µg/mL estabelecida para a produção de ácidos para o mesmo micro-organismo.

### 5.7.2. Caracterização físico-química da microemulsão

Após o desenvolvimento do enxaguatório bucal, algumas propriedades físico-químicas foram analisadas, a fim de investigar se a formulação apresentava características de um sistema microemulsionado proposto.

Uma microemulsão é caracterizada por ser um sistema termodinamicamente estável e isotropicamente translúcido de dois líquidos imiscíveis (óleo/água ou vice versa), estabilizados por um filme interfacial de tensoativos (ROSSI et al., 2007).

Sistemas microemulsionados são compostos por partículas dispersas e dinâmicas cujo diâmetro varia entre 5 a 100 nm (ROSSI et al., 2007). A análise do tamanho de gotículas juntamente com o índice de polidispersividade, o qual indica a distribuição do peso molecular das partículas, permite evidenciar, juntamente com outros parâmetros, a obtenção ou não de um sistema microemulsionado. Assim, o tamanho de gotículas da formulação de aproximadamente 25 nm e o índice de polidispersividade calculado em 0,214, indicam obtenção de uma microemulsão. As nanogotículas contribuem para um sistema termodinamicamente mais estável e diminuem a dispersão do mesmo, uma vez que são menos suscetíveis a sedimentação e floculação. (ROSSI et al., 2007).

Após a centrifugação por 30 min, 956 g, à temperatura ambiente, não houve precipitação de partículas nem separação de fases, o que indicou um sistema isotrópico de fase única estável.

Através do potencial zeta, podemos avaliar a movimentação de partículas carregadas através de uma dispersão líquida, ou seja, a interação eletrostática das partículas presentes no referente meio disperso. O potencial zeta diferente de zero, seja ele negativo ou positivo, indica que há repulsão entre as partículas do sistema, que contribui favoravelmente para a estabilidade da dispersão, uma vez que essas partículas apresentam menor probabilidade de se

agregarem (PATEL et al., 2010). Assim, a determinação do potencial zeta da microemulsão em -1,21 mV indica a obtenção de um sistema estável, devido à pequena carga negativa das partículas.

As medidas de condutividade apresentam-se como um importante meio na determinação de domínios contínuos aquosos ou oleosos em um sistema microemulsionado (LAWRENCE; REES, 2000). Assim, a condutividade determinada em 1246,67  $\mu\text{S}/\text{cm}$  para a formulação enxaguatória indica a habilidade da solução aquosa em conduzir corrente elétrica devido à presença de íons, o que sugere uma microemulsão óleo em água com microgotículas diretas, ou seja, um sistema aquoso no qual a fase oleosa está dispersa. Logo, a cabeça polar do tensoativo é voltada para a fase contínua aquosa, enquanto a cauda apolar se dirige para o interior hidrófobo da micela (GOMES, 2009).

A viscosidade, por sua vez, pode ser considerada como a resistência ao escoamento de um líquido, sendo ela controlada pelas forças de atrito interno entre os átomos desse líquido. Quanto maior o escoamento de um líquido sobre determinada superfície, melhor será a adesão. Através do gráfico tensão de cisalhamento *versus* gradiente de cisalhamento apresentado na Figura 20 (página 53), podemos inferir a partir da relação linear obtida que a formulação possui um comportamento reológico característico de fluidos newtonianos, o que é esperado para a maioria das soluções dissolvidas de tensoativos (iônicos ou não iônicos) (ROSSI et al., 2007). Isso quer dizer que a constante de proporcionalidade da reta é a própria viscosidade, calculada em 2,28 cP. Assim, o enxaguatório possui viscosidade uniforme independente do grau de deformação, característica favorável a manutenção da viscosidade independentemente de fatores como agitação e tempo de bochecho, por exemplo.

Outra característica importante dos enxaguatórios bucais é seu valor de pH, que quando abaixo de 5,5 é considerado crítico para a dissolução dos tecidos dentários, dependendo do tempo de exposição (LIMA et al., 2005). Assim, o ideal é que o pH de um enxaguatório esteja acima desse valor e próximo ao pH fisiológico da cavidade oral, ao redor de 7. Logo, o pH 6,56 apresentado pela formulação encontra-se dentro dos limites aceitáveis.

## 5.8. Avaliação da dispersão do óleo essencial no enxaguatório bucal

### 5.8.1. Fracionamento do enxaguatório bucal contendo óleo essencial por partição líquido-líquido e caracterização química das frações orgânicas

A partição foi realizada com 10 mL da formulação contendo 1 mg/mL de óleo essencial. Assim, caso obtivéssemos um rendimento ideal de 100% no processo de extração, a massa esperada de óleo essencial seria equivalente a 10 mg.

Como apresentado na Tabela 10 (página 53), as massas obtidas para as partições da formulação contendo óleo essencial foram subtraídas das massas obtidas para as partições da formulação sem óleo essencial, a fim de descontar possíveis interferentes apolares que pudessem ter afinidade com os solventes orgânicos que não o próprio óleo.

A massa resultante da partição hexânica foi 2,9 mg. Como o n-hexano é um solvente de baixa polaridade, é esperado que ele tenha maior afinidade com o óleo essencial, permitindo assim a extração deste na fase orgânica. Porém, para assegurar que todo o óleo essencial fosse extraído, utilizamos também um solvente de maior polaridade, o acetato de etila. Através dessa extração, foi obtida uma massa equivalente a 51,1 mg, a qual é superior à massa obtida na extração hexânica e também à quantidade de óleo essencial contido na formulação de partida. Assim, podemos inferir que a partição com acetato de etila não foi seletiva para o óleo essencial e provavelmente extraiu compostos menos apolares da formulação.

A análise química das frações orgânicas foi realizada a fim de confirmar essas hipóteses. Nas Tabelas 11 e 14 (página 56) podemos observar que os componentes extraídos da partição com acetato de etila tanto para a formulação contendo óleo essencial quanto para a formulação sem óleo essencial (formulação base) foram os componentes mentol e metilparabeno.

Através da análise das Tabelas 13 e 14, podemos observar que os componentes extraídos pela partição hexânica foi o mentol, para a formulação base, e mentol, teresantalol, palustrol e espatulenol, para a formulação contendo óleo essencial.

O mentol e o metilparabeno apresentam baixa solubilidade em água e, portanto, no preparo da microemulsão, foram incorporados inicialmente à fase oleosa. O metilparabeno é um derivado do ácido p-hidroxibenzoico e apresenta solubilidade em água de 0,25% (p/p) a 25°C, enquanto o mentol é um componente obtido de óleos essenciais e é praticamente insolúvel em água, porém solúvel em solventes orgânicos como éter de petróleo e álcool etílico. Logo, eram esperadas suas afinidades com o solvente acetato de etila e consequentemente suas extrações nessa fase.

Enquanto o metilparabeno foi extraído apenas na fase acetato, devido sua maior afinidade com solventes orgânicos mais polares, o mentol foi encontrado tanto na fase acetato de etila quanto na fase hexânica de ambas as formulações, sendo o único componente (100%) da extração hexânica da formulação base. Tal fato explica a menor concentração de mentol obtida na fração acetato de etila desta formulação (31,93%), em relação à concentração de 74,2% obtida na extração acetato da formulação contendo óleo essencial.

Com exceção do mentol, todos os outros componentes químicos presentes na fração hexânica da formulação contendo óleo essencial são metabólitos secundários encontrados no óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria*, conforme apresentado na Tabela 6 (referente ao óleo essencial obtido da coleta de fevereiro/2013, utilizado nesta formulação, página 46). Palustrol e teresantalol são dois dos componentes majoritários identificados neste óleo, enquanto espatulenol corresponde ao oitavo componente de maior concentração entre os identificados.

Tal resultado indica que a primeira partição realizada com n-hexano foi mais seletiva aos componentes do óleo da formulação completa, no entanto, poucos componentes presentes originalmente no óleo essencial foram obtidos através deste procedimento. Assim, através da comparação das massas e cromatogramas obtidos para a fração hexânica da formulação contendo óleo essencial, podemos inferir que houve uma perda de 7,1 mg durante o processo de partição ou que a massa inicial de óleo essencial presente em 10 mL da formulação era inferior a 10 mg, indicando uma possível não homogeneidade do óleo essencial no sistema.

### **5.8.2. Hidrodestilação do enxaguatório bucal contendo óleo essencial e caracterização química da fração hidrodestilada**

Um volume de 10 mL de enxaguatório contendo 10 mg de óleo essencial foi submetido ao processo de hidrodestilação. A amostra hidrodestilada foi submetida à partição com 20 mL de n-hexano e, após a concentração do volume, a amostra e um padrão de óleo essencial 1 mg/mL preparado em n-hexano foram injetados separadamente no cromatógrafo à gás e analisado sob mesmas condições. As proporções e a quantidade de picos esperados para ambas as amostras deveriam ser próximas, porém não idênticas, em função das prováveis perdas no processo de extração.

No entanto, através da análise do cromatograma apresentado na Figura 23 (página 57) e dos componentes identificados na Tabela 15 (página 58), podemos constatar a ausência de quase todos os constituintes químicos presentes originalmente no óleo essencial de *A.*

*arenaria* (vide Tabela 6, página 46) no produto de hidrodestilação da formulação do enxaguatório bucal.

O mentol representou 91,08% da massa total extraída, e 92,83% quando somado com as porcentagens de seus estereoisômeros neomentol e isomentol. O mentol detectado na formulação hidrodestilada corresponde ao mentol cristalizado (Mapric) adicionado em seu preparo, como agente de refrescância. Os outros monoterpenos detectados no produto de hidrodestilação (isopulegol, p-mentona, pulegona, carvona, piperitona e mentil acetato) são constituintes que estão presentes nas espécies vegetais utilizadas como fonte de mentol, sendo a principal fonte a espécie *Mentha piperita* (SANTOS, 2011). Não foi informado o grau de pureza do produto pelo fabricante, no entanto, os outros componentes detectados indicam que o produto estava impuro.

Apenas o sesquiterpeno espatulenol presente no óleo essencial de *A. arenaria* foi também identificado na formulação, no entanto, tal componente também pode ser encontrado nos óleos essenciais das espécies utilizadas como fonte de mentol.

Assim, a análise do perfil cromatográfico da amostra hidrodestilada demonstra que o óleo essencial não foi extraído do enxaguatório bucal através do processo de hidrodestilação. Apesar das possíveis perdas experimentais que poderiam ocorrer, esse resultado sugere que o óleo essencial não está homogeneamente disperso no enxaguatório bucal.

### **5.9. Avaliação da atividade antimicrobiana do enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* e de suas frações obtidas por partição líquido-líquido**

A triagem dos óleos essenciais em relação à atividade antimicrobiana foi realizada com diferentes micro-organismos bucais considerados importantes na etiologia da cárie dental. No entanto, para a formulação, optamos por realizar os testes de atividade antimicrobiana apenas contra *S. mutans*, visto seu papel de destaque na formação do biofilme dental cariogênico (LOESCHE, 1986).

As frações acetato de etila das formulações com e sem óleo essencial não apresentaram atividade inibitória, assim, podemos inferir que o mentol e o metilparabeno extraídos nessas frações foram inativos nas concentrações testadas.

A fração hexânica da formulação base, contendo exclusivamente o componente mentol, também não apresentou atividade nessas condições. A formulação inicial continha 40 mg de mentol, no entanto, como este componente foi extraído também na fase acetato, não é possível

estimar sua concentração na fase hexânica. A concentração inibitória mínima encontrada para o óleo essencial de *Mentha piperita*, uma das principais fontes do mentol, foi determinada em 625 µg/mL para *S. mutans* (ALVES; FREIRES; DE CASTRO, 2010). Alguns estudos apontam o mentol como o componente majoritário responsável pela atividade bactericida deste óleo essencial (ISCAN et al., 2002). No entanto, alguns autores demonstraram atividade antimicrobiana significativa em óleos essenciais de *Mentha piperita* contendo baixas concentrações de mentol, o que indica a importância dos outros componentes químicos para atividade, que não deve ser associada exclusivamente ao mentol (YADEGARINIA, 2006).

A fração hexânica da formulação contendo óleo essencial foi a única fração a apresentar atividade e a única fração na qual foram detectados alguns componentes do óleo essencial de *A. arenaria*. Vale ressaltar que apesar do mentol representar 82,31% da composição total desta fração, sua atividade deve ser atribuída aos outros componentes minoritários, e não ao mentol, uma vez que a fração hexânica contendo 100% de mentol não apresentou atividade. Assim, podemos atribuir a atividade encontrada ao conjunto ou a algum dos componentes teresantalol, palustrol e espatulenol detectados.

A formulação completa do enxaguatório bucal apresentou concentração inibitória mínima igual a 200 µg/mL, levando-se em consideração a concentração de óleo essencial presente. Assim, segundo a classificação de Saleem e colaboradores, 2010, o enxaguatório bucal pode ser considerado como moderadamente ativo frente a *S. mutans*.

No entanto, a formulação base também apresentou atividade na mesma diluição que a formulação contendo óleo essencial, indicando que a moderada atividade encontrada se deve a componentes comuns em ambas as formulações e não ao óleo essencial. Assim, a mistura de tensoativos e cotensoativo, o benzoato de sódio, sacarina sódica e/ou o fluoreto de sódio podem estar relacionados com a atividade encontrada para ambas formulações.

Dados da literatura demonstram que o benzoato de sódio é um agente químico efetivo contra quase todos os tipos de micro-organismos como fungos, leveduras e bactérias, além de ser relatada sua atividade *in vitro* contra *S. aureus* resistentes à meticilina (KARABAY; SAHIN, 2005).

Um estudo demonstrou que dentifrícios contendo fluoreto de sódio foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* de *S. mutans* isolados clinicamente (SOUZA-GUGELMIN et al., 2006). Formulações contendo 1.100 ppm e 1.000 ppm associado ao extrato de própolis inibiram 100% o crescimento das linhagens. Por outro lado, uma formulação contendo 500 ppm de fluoreto de sódio (a mesma concentração encontrada no enxaguatório bucal) inibiu

69% do crescimento de *S. mutans*. Assim, pode-se observar um efeito antimicrobiano dose dependente do fluoreto de sódio.

Assim, com a adição de agentes potenciais à inibição do crescimento de micro-organismos na formulação, seria esperada uma ação antimicrobiana *in vitro* mais efetiva para a microemulsão do que para o óleo essencial isoladamente. No entanto, como não foi observado nenhum efeito sinérgico, e a concentração inibitória mínima para *S. mutans* do enxaguatório bucal (100 µg/mL) é aproximadamente 6,4 vezes maior do que a concentração inibitória do óleo essencial isolado (15,6 µg/mL), esse resultado condiz com os resultados e discussão das seções 4.8 e 5.8, nas quais discorremos sobre possíveis problemas farmacotécnicos de dispersão do óleo essencial na microemulsão.

#### **5.10. Determinação do tempo de morte celular em culturas de *S. mutans* tratadas com o enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria***

Foi analisada a cinética de ação do óleo essencial e do enxaguatório bucal sobre o crescimento de *S. mutans*, a fim de se estabelecer o tempo mínimo em que as amostras provocam uma redução de 99,9% na população do inóculo original.

O efeito bactericida do óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* e do enxaguatório contendo óleo essencial ocorreu após 24 h de contato dos micro-organismos com as amostras, enquanto o tratamento com o enxaguatório Periogard<sup>®</sup> promoveu efeito bactericida a partir do tempo zero de incubação.

Os tempos de 10 e 30 min foram escolhidos pois tempos próximos a esse intervalo seriam ideais para promoção da morte celular bacteriana, visto a recomendação de 30 min sem ingestão de água e alimentos pelo usuário de enxaguatórios bucais.

A formulação sem óleo essencial também promoveu a eliminação total da população de *S. mutans* após 24 h de exposição, o que sugere que outros componentes do enxaguatório além do óleo contribuem para a atividade bactericida. No entanto, era de se esperar uma ação bactericida mais rápida para o enxaguatório contendo óleo essencial, visto o efeito sinérgico do óleo com os demais componentes da formulação base. Tal resultado, semelhante a atividade antimicrobiana muito maior encontrada para o enxaguatório bucal do que para o óleo isolado, também condiz com a hipótese de que o óleo essencial não se encontra homogeneamente disperso no sistema da formulação.

#### **5.11. Avaliação da citotoxicidade do enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria***

As reações adversas com materiais odontológicos podem ser locais ou sistêmicas e acontecer com todas as classes de materiais (VITRAL et al., 2008). A biocompatibilidade é definida pela composição, posição e interação do material com a cavidade bucal, que pode resultar em diferentes respostas biológicas tóxicas, inflamatórias, alérgicas ou mutagênicas (CRAIG, 1993). Poucos materiais odontológicos são totalmente biocompatíveis, uma vez que a maioria contém uma variedade de ingredientes capazes de promover reações tóxicas ou irritantes, dependendo do tempo de exposição (PHILLIPS, 1993). Assim, os testes de citotoxicidade estão entre os recomendados pela *Council on Dental Materials, Instruments and Equipment of the American Dental Association* para o estudo da biocompatibilidade de materiais odontológicos (GODOI, 2013).

O enxaguatório contendo óleo essencial e o enxaguatório Periogard<sup>®</sup> foram testados sob as mesmas condições experimentais e nas mesmas diluições (4 a 80 vezes diluídos). Ambos demonstraram um efeito dose-resposta sobre a viabilidade, no entanto, Periogard<sup>®</sup> interferiu na proliferação dos fibroblastos gengivais em diluições maiores.

Enquanto o enxaguatório contendo óleo essencial na diluição 10 vezes apresentou aproximadamente 100% de viabilidade celular, Periogard<sup>®</sup> reduziu a viabilidade para aproximadamente 5%, demonstrando-se muito mais citotóxico do que a microemulsão desenvolvida neste trabalho.

O enxaguatório bucal provocou reduções na viabilidade ( $p < 0,05$ ) apenas em diluições iguais ou acima de 6,6 vezes, a qual ainda permitiu aproximadamente 68% do crescimento celular. Nesta diluição, a concentração de óleo essencial na formulação é equivalente a 151,5  $\mu\text{g/mL}$ , caso este estivesse totalmente disperso. Como é possível observar na Figura 17 (página 49), sob as mesmas condições experimentais, o óleo essencial isolado apresenta efeitos inibitórios sobre a proliferação dos fibroblastos apenas em concentrações iguais ou maiores a 300  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,05$ ), apresentando uma  $CI_{50}$  para a proliferação celular igual a 450,6  $\mu\text{g/mL}$ . Assim, podemos inferir que mesmo na menor diluição testada (4 vezes), em que a concentração de óleo essencial é de 250  $\mu\text{g/mL}$ , a citotoxicidade apresentada pelo enxaguatório não pode ser atribuída ao óleo essencial veiculado, mas sim, a algum outro componente da formulação ou a combinação destes com óleo.

A fim de tornar o enxaguatório mais biocompatível, a citotoxicidade dos componentes isolados poderia ser avaliada para detecção dos agentes responsáveis pela atividade anti-proliferativa, o que permitiria futuros ajustes em sua composição. No entanto, vale ressaltar

que os resultados obtidos podem não ser os mesmos da clínica, já que os ensaios *in vitro* não levam em consideração a dinâmica tecidual (BUSKÜHL, 2007).

Além disso, não existem no mercado materiais 100% seguros e isentos de reações adversas, assim, cabe ao profissional e ao consumidor avaliarem os potenciais riscos e benefícios dos produtos disponíveis, e se os benefícios se sobrepõem sobremaneira aos possíveis riscos (VITRAL et al., 2008).

As diluições de 4 a 10 vezes do enxaguatório Periogard<sup>®</sup> reduziram a viabilidade para taxas menores que 5%. Esses valores comparam-se ao efeito anti-proliferativo causado pela solução aquosa de dodecilsulfato de sódio 20%, utilizado como controle positivo para citotoxicidade.

Como discutido anteriormente e apresentado no gráfico da Figura 18 (página 50), não houve diferença significativa quando os fibroblastos foram incubados com dodecilsulfato de sódio 20% e digluconato de clorexidina 0,12%, sendo que ambos os tratamentos reduziram drasticamente o número de células viáveis. Assim, o potencial citotóxico encontrado para o enxaguatório Periogard<sup>®</sup> se deve provavelmente à presença de digluconato de clorexidina em sua composição.

O mecanismo de citotoxicidade da clorexidina está relacionado com alterações no potencial da membrana mitocondrial e na montagem actínica do citoesqueleto, induzindo as células à apoptose e à morte celular autofágica/necrótica (GIANNELLI et al., 2008). Segundo Lee e colaboradores, 2010, a citotoxicidade da clorexidina é tempo, frequência e concentração dependentes, embora o efeito anti-proliferativo sobre fibroblastos gengivais seja praticamente igual em curtos e longos tempos de exposição.

Ainda, esses mesmos autores verificaram que a clorexidina é capaz de inibir a síntese de colágeno de células osteoblásticas, o qual possui importante papel na cicatrização de feridas. Logo, a aplicação direta de clorexidina em tratamentos de doenças periodontais e peri-implantar pode interferir negativamente na regeneração da mucosa oral, em função dos efeitos tóxicos não seletivos sobre fibroblastos gengivais, células endoteliais e osteoblastos alveolares (GODOI, 2013). Logo, ressalta-se a necessidade da busca de novos produtos para higiene bucal que sejam efetivos e não possuam tantos efeitos colaterais, como é o caso da clorexidina.

## **5.12. Efeito da formulação de enxaguatório bucal contendo óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* sobre a formação do biofilme de *S. mutans***

Como discutido anteriormente nas seções 5.9 e 5.8, a formulação de enxaguatório bucal, apesar de físico-quimicamente estável, apresentou possíveis problemas na distribuição e dispersão do óleo essencial no sistema. Assim, para evitar a obtenção de falsos resultados, optou-se por testar o óleo essencial diretamente sobre o biofilme de *S. mutans* ao invés da formulação, pois não haveria tempo hábil para as correções farmacotécnicas necessárias.

Além disso, se comprovada a efetividade do óleo essencial contra o biofilme de *S. mutans*, é evidente que uma formulação na qual o mesmo esteja adequadamente incorporado e estável também apresentará as mesmas propriedades.

As bactérias do biofilme oral sofrem agressões diárias as quais outras microbiotas do corpo humano não são submetidas. Assim, em resposta à mastigação, salivagem, movimentos da língua e práticas de higiene diárias como escovação e utilização do fio dental pelo hospedeiro, essas microbiotas necessitam desenvolver mecanismos de defesas para sobreviver a essas práticas inibitórias (AVILA; OJCIUS; YILMAZ, 2009).

A resistência de um biofilme pode ser avaliada através da razão das concentrações ( $R_c$ ) ou através da razão dos tempos ( $R_t$ ) de exposição efetivos para atingir a mesma redução de células em um biofilme e de células planctônicas (BRIDIER et al., 2011).

Revisões da literatura demonstram que a  $R_c$  requerida para alcançar a mesma redução em uma população planctônica ou em um biofilme pode variar em torno de 1 a 1.000 vezes, de acordo com o agente antimicrobiano e da espécie de micro-organismo estudado (BRIDIER et al., 2011).

Um estudo indicou que os óleos essenciais de eucalipto, orégano, além dos compostos isolados carvacrol e timol apresentaram  $R_c$  aproximadamente igual a 4 para atingir o mesmo efeito em biofilme de *Staphylococcus epidermidis*. Por outro lado, o óleo essencial de melaleuca apresentou a mesma atividade bactericida em biofilme em uma concentração 16 vezes maior que a concentração efetiva em células livres (NOSTRO et al., 2007; KARPANEN et al., 2008).

Coincidentemente, a concentração escolhida de 250  $\mu\text{g/mL}$  para ser veiculada na formulação, é 4 vezes maior do que a concentração bactericida mínima encontrada *in vitro* para *S. mutans* planctônicos (62,5  $\mu\text{g/mL}$ ).

Os sistemas *in vitro* apresentam grandes vantagens como maior facilidade operacional, rápida avaliação, controle de variáveis externas, ausência de utilização animal direta e, devido a sua sensibilidade, permitem que os materiais tóxicos sejam descartados previamente aos experimentos em animais (BATISTA et al., 2002). No entanto, a maior dificuldade desses sistemas encontra-se na extrapolação dos resultados para o *in vivo*, que possuem natureza

dinâmica por envolver uma série de complexos processos biológicos interdependentes (LIN; LU, 1997). Logo, a fim de extrapolar a dose efetiva *in vitro* para bactérias planctônicas, também optamos por testar a concentração de 1.000 µg/mL de óleo essencial de *A. arenaria*, ou seja, uma concentração 16 vezes maior que a concentração bactericida mínima.

### 5.12.1. Viabilidade bacteriana do biofilme

A análise microbiológica do biofilme se deu através da contagem do número de colônias viáveis semeadas em meio de cultura sólido após quatro dias de tratamento dos biofilmes com solução de sacarose 10% e três dias de tratamento com as amostras. A sacarose foi escolhida como fonte de energia por ser considerada o substrato mais cariogênico, uma vez que pode ser utilizada tanto para a produção de ácidos quanto para a síntese de polissacarídeos extracelulares e intracelulares pelas bactérias do biofilme (LEITES et al., 2006).

O digluconato de clorexidina 0,12% foi o único tratamento a apresentar uma redução significativa no número de colônias quando comparado ao controle positivo para crescimento NaCl 0,9% ( $p < 0,05$ ), sendo detectada ausência total de crescimento bacteriano em todas as placas de ágar analisadas.

Segundo Marsh, 2010, os produtos para saúde oral devem tentar controlar os níveis da placa, sem removê-la, pois remover o biofilme totalmente implicaria em eliminar as propriedades benéficas da microbiota oral. A maioria dos micro-organismos bucais mantêm relações de simbiose com o hospedeiro, e, inclusive, são responsáveis por impedir a aderência de espécies patogênicas às superfícies da cavidade oral (AVILA; OJCIUS; YILMAZ, 2009). Assim, quando o hospedeiro tem hábitos de higiene regulares, a utilização de produtos contendo digluconato de clorexidina poderia implicar no desequilíbrio da microbiota oral não patogênica.

A contagem total das colônias viáveis do biofilme não diferiram entre os tratamentos com NaCl 0,9%, o solvente DMSO 1%, e os óleos essenciais nas concentrações de 250 e 1.000 µg/mL ( $p > 0,05$ ). Portanto, pode-se inferir que, apesar do óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* apresentar atividade antimicrobiana promissora contra *S. mutans* planctônicos, o mesmo não foi ativo contra o biofilme, sugerindo que a Rc deste óleo essencial é maior que 16.

Esse resultado condiz com a ideia de que as células de um biofilme são menos suscetíveis aos agentes antimicrobianos (MARSH, 2005). Assim, a concentração bactericida do óleo essencial para células livres não garante a mesma efetividade em sistemas complexos como o biofilme, no qual há desafios como maior densidade celular e maior organização espacial

através dos polissacarídeos extracelulares. Essa organização dinâmica e tridimensional conferida pela matriz exopolissacarídica pode dificultar a penetração dos agentes antimicrobianos às camadas celulares mais internas, aumentando a virulência das células sésseis (BRIDIER et al., 2011).

Segundo Mikkelsen e colaboradores, 2007, um método promissor para a aplicação de óleos essenciais contra biofilmes seria através da vaporização dos componentes voláteis sobre o mesmo, a fim de driblar as barreiras físicas conferidas pela organização destes sistemas e facilitar a penetração do óleo nos alvos biológicos.

A alta capacidade de resistência de um biofilme a determinados agentes antimicrobianos também pode estar associada à diferente expressão gênica dessas bactérias. No biofilme, a densidade celular é consideravelmente maior do que em células planctônicas, assim, as bactérias se encontram em um ambiente com maiores limitações da quantidade de nutrientes, oxigênio, metabólitos secundários e maiores perdas de fatores secretados. Logo, é de se esperar que a expressão gênica das células sésseis seja diferente das células livres, tornando-se mais virulentas (MIKKELSEN et al., 2007).

### **5.12.2. Determinação de polissacarídeos**

Os polissacarídeos extracelulares representam até 40% do peso seco de um biofilme oral e são, em sua maioria, sintetizados a partir da reação das enzimas bacterianas glicosiltransferases (Gtf) e frutossiltransferases (Ftf) com o substrato sacarose (KLEIN et al., 2009).

O micro-organismo *S. mutans* é considerado um dos maiores contribuintes para a formação de polissacarídeos extracelulares na matriz do biofilme, por produzir três tipos enzimáticos diferentes de Gtfs: GtfB, responsável por sintetizar a maioria dos glucanos insolúveis; GtfC, que sintetiza uma mistura de glucanos insolúveis e solúveis; e GtfD, a qual sintetiza predominantemente glucanos solúveis (KURAMITSU, 2003). Além disso, *S. mutans* também possui a enzima Ftf responsável por sintetizar frutanos, os quais também estão relacionados com o processo de formação do biofilme e com a cárie dental (KOO; XIAO; KLEIN, 2009).

Os polissacarídeos extracelulares, especialmente os glucanos produzidos por *S. mutans*, podem contribuir para a patogenicidade do biofilme de diversas formas: 1) aumentam a adesão e o acúmulo de *S. mutans* e outros micro-organismos bucais sobre a superfície; 2) promovem integridade e estabilidade mecânica à matriz extracelular, permitindo novas células microbianas estabelecerem microcolônias; 3) protegem os micro-organismos da ação de

antimicrobianos e de outras agressões do ambiente; 4) atuam como reserva adicional de fonte de energia; 5) limitam a difusão de substâncias para dentro e fora do biofilme e 6) concentram íons metálicos e outros nutrientes dentro do microambiente (KOO; XIAO; KLEIN, 2009).

Assim, um agente que não promova morte direta das células do biofilme, mas que interfira na produção ou estabilidade dos polissacarídeos extracelulares, ainda será de grande interesse terapêutico.

A mudança na proporção de carboidratos solúveis e insolúveis pode ser mais relevante para a cariogenicidade do biofilme do que a quantidade total (AIRES et al., 2008). No entanto, a proporção encontrada para os diferentes tipos de carboidratos foram as mesmas para todos os tratamentos, sendo os polissacarídeos extracelulares insolúveis os constituintes majoritários dos carboidratos totais, seguidos pelos polissacarídeos intracelulares e, por fim, os polissacarídeos extracelulares solúveis.

Não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) na concentração de polissacarídeos extracelulares solúveis extraídos dos biofilmes de todos os tratamentos. No entanto, apesar de não significativo, o tratamento com digluconato de clorexidina 0,12% promoveu uma redução de aproximadamente 6 vezes na concentração desses carboidratos quando comparado ao controle negativo NaCl 0,9%.

A habilidade de *S. mutans* em utilizar alguns polissacarídeos extracelulares solúveis (glucanos e frutanos) como carboidratos de reserva, oferece uma vantagem adicional em situações de privação de nutrientes, e, simultaneamente aumenta a quantidade produzida de ácidos e a extensão da acidificação (BURNE et al., 1996). A persistência do ambiente ácido leva a seleção de micro-organismos altamente ácido-tolerantes e o baixo pH da matriz do biofilme resulta na dissolução da superfície do esmalte dental (KOO; XIAO; KLEIN, 2009). Assim, a inibição da síntese de carboidratos solúveis por um agente antimicrobiano é um mecanismo de grande interesse terapêutico no combate ao biofilme cariogênico.

No grupo dos polissacarídeos extracelulares insolúveis, o tratamento com digluconato de clorexidina 0,12% foi o único capaz de promover uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na síntese destes polissacarídeos.

Os óleos essenciais em ambas as concentrações testadas foram capazes de reduzir significativamente apenas a concentração dos polissacarídeos intracelulares ( $p < 0,05$ ). A capacidade de estocar carboidratos como polissacarídeos intracelulares (na forma de glicogênio, por exemplo) é uma propriedade das bactérias do biofilme dental. Diferentemente dos polissacarídeos extracelulares, que são formados essencialmente a partir da sacarose, polissacarídeos intracelulares podem ser formados a partir de qualquer tipo de carboidrato que

possa ser convertido em glucose-1-fosfato, como a glucose, lactose, maltose e também a sacarose (LEITES et al., 2006). Os polissacarídeos intracelulares são utilizados como reserva energética e podem ser metabolizados quando outras fontes de carboidratos estão ausentes, como nos períodos de jejum do hospedeiro. Assim, a interferência na síntese e armazenamento desses carboidratos pode diminuir as chances de sobrevivência das bactérias do biofilme dental.

### 5.12.3. Determinação do pH do biofilme bacteriano

Os valores de pH dos meios de cultura foram monitorados ao fim de cada 24 h, durante cinco dias de incubação e tratamentos dos biofilmes.

Após o terceiro dia (tempo de 72 h na Figura 26, página 64), o pH dos biofilmes expostos aos tratamentos NaCl 0,9%, DMSO 1% e aos óleos essenciais nas concentrações de 250 e 1.000 µg/mL, atingiram valores abaixo de 5,5, os quais podem ser considerados críticos para a dissolução do esmalte dental (LIMA et al., 2005).

Assim, apesar do óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* apresentar efetiva atividade inibitória *in vitro* contra a produção de ácidos orgânicos por *S. mutans* planctônicos, tal efeito inibitório não foi verificado para o biofilme da mesma espécie.

O biofilme foi exposto oito vezes ao dia a soluções de sacarose 10% e apenas duas vezes ao dia aos tratamentos com os óleos essenciais, simulando uma dieta de alto desafio cariogênico. A dieta é um fator que pode contribuir para a patogenicidade do biofilme, uma vez que a ingestão de alimentos ricos em sacarose, amido e outros carboidratos fermentáveis disponibiliza maior quantidade de substratos para a produção de polissacarídeos extracelulares e intracelulares, além de levar ao acúmulo de ácidos provenientes do metabolismo bacteriano (BOWEN, 2002). Ainda, os polissacarídeos extracelulares do biofilme podem contribuir para menor difusão e, conseqüente, maior concentração dos ácidos produzidos, o que explicaria a divergência dos resultados da ação do óleo essencial sobre a produção de ácidos por bactérias livres e por bactérias sésseis.

### 5.13. Aplicação de método estatístico multivariado aos dados químicos (OPLS-DA)

O OPLS-DA é uma técnica de análise multivariada supervisionada específica do *software* SIMCA capaz de realizar uma separação das variações da matriz X (matriz de variáveis independentes) em duas partes, uma linearmente relacionada à matriz resposta Y e outra que é ortogonal à Y. A variação preditiva de Y em X é modelada pelas variáveis preditivas. A

variação em X que é ortogonal à Y é modelada pelas variáveis ortogonais. Deste modo, o OPLS-DA melhora significativamente a interpretação das análises, pois todas as variáveis que não estão correlacionadas com a resposta (matriz Y) serão ortogonalizadas.

Este método encontra em um espaço multidimensional gerado por todas as suas variáveis e amostras (matriz X) qual é a direção com maior quantidade destas variáveis que estejam correlacionadas com a resposta observada (matriz Y). Logo, o programa projeta essa direção em um hiperplano bidimensional, como apresentado na Figura 27 (página 66). Este gráfico de dispersão foi gerado com base na composição química dos óleos essenciais e demonstra uma completa separação das diferentes classes (respostas ativas, moderadamente ativas, fracamente ativas e inativas). Isto significa que cada classe possui um tipo muito particular de composição química, explicando as respostas observadas.

As substâncias carotol, *trans*- $\alpha$ -bergamoteno,  $\alpha$ -cariofileno,  $\beta$ -bisaboleno e ácido palmítico foram consideradas relevantes em termos estatísticos para a atividade antimicrobiana encontrada, juntamente com outros nove componentes não identificados. Entretanto, é importante ressaltar que nem sempre o que é estatisticamente significativo predito por um modelo matemático, é necessariamente significativo do ponto de vista biológico. No entanto, a utilização do método facilita o direcionamento para isolar substâncias, as quais podem ser testadas separadamente ou em conjunto, a fim de comprovar suas bioatividades.

Dados da literatura indicaram que o carotol isoladamente apresentou ótima atividade antimicrobiana contra fungos, a qual foi aumentada quando testado sinergicamente com o sesquiterpeno daucol (JASICKA-MISIAK, 2004). Vale ressaltar que este sesquiterpeno foi o constituinte majoritário do óleo essencial das inflorescências de *A. arenaria* coletadas em fevereiro de 2012, correspondendo a 12,67% da composição total.

Outro estudo foi realizado a fim de determinar o efeito de ácidos graxos de cadeia curta e longa sobre a viabilidade de micro-organismos bucais (HUANG et al., 2011). Em concentração igual a 25  $\mu\text{g/mL}$ , todos os ácidos graxos foram inativos contra *S. mutans*, com exceção do ácido hexanóico e do ácido palmítico. Este último também apresentou atividade contra *S. gordonii* e bactérias gram-negativas como *P. gingivalis* e *F. nucleatum*.

Assim, as propriedades antimicrobianas já descritas para alguns dos componentes indicados como responsáveis pela atividade do óleo essencial, fortalecem a validade da predição do modelo estatístico empregado.

*Conclusões*

## 6. Conclusões

Considerando os resultados obtidos neste trabalho de acordo com os métodos utilizados, pode-se concluir que:

**6.1.** Entre os componentes voláteis analisados, o óleo essencial das inflorescências de *Aldama arenaria* demonstrou ser o mais promissor em relação a suas atividades antimicrobianas e anticariogênicas

**6.2.** O óleo essencial das inflorescências de *Aldama arenaria* em concentrações iguais ou menores que 250 µg/mL pode ser considerado seguro e não citotóxico frente a fibroblastos gengivais humanos após contato por 30 minutos.

**6.3.** As concentrações bactericidas do óleo essencial das inflorescências de *Aldama arenaria* determinadas para os micro-organismos planctônicos *S. mutans*, *S. mitis*, *L. casei* e *S. salivarius*, bem como a concentração capaz de reduzir 50% da produção de ácidos de *S. mutans in vitro*, não foram citotóxicas para fibroblastos gengivais humanos.

**6.4.** O tempo necessário para o óleo essencial das inflorescências de *Aldama arenaria* na concentração de 62,5 µg/mL promover a morte celular de *S. mutans* planctônico é de 24 horas.

**6.5.** A microemulsão formulada contendo óleo essencial das inflorescências de *Aldama arenaria* foi caracterizada como um sistema estável com base nas propriedades físico-químicas avaliadas.

**6.6.** Por meio das análises comparativas realizadas por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas do óleo essencial obtido diretamente da planta e do óleo essencial obtido por extração de um volume determinado do enxaguatório bucal, foi possível constatar que o óleo essencial não estava disperso homogeneamente no sistema.

**6.7.** O enxaguatório bucal contendo óleo essencial de *Aldama arenaria* apresentou citotoxicidade frente aos mesmos fibroblastos significativamente menor do que o enxaguatório Periogard<sup>®</sup>, um produto já consagrado no mercado.

**6.8.** O óleo essencial das inflorescências de *Aldama arenaria* não apresentou atividade inibitória sobre o biofilme de *S. mutans* nas concentrações 250 e 1000 µg/mL, porém, essas mesmas concentrações foram capazes de reduzir a síntese de polissacarídeos intracelulares pelas bactérias do biofilme cariogênico.

**6.9.** Apesar do óleo essencial das inflorescências de *Aldama arenaria* não apresentar atividade contra o biofilme, os valores de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima apresentados por este óleo frente a *S. mutans* planctônico, o qual é considerado um dos principais iniciadores do processo de formação da cárie e do próprio biofilme, abrem perspectivas para a aplicação dos constituintes deste óleo essencial em formulações de enxaguatórios bucais.

## *Referências*

AAS, J. A.; PASTER, B. J.; STOKES, L. N.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F. E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5721-5732, 2005.

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4<sup>a</sup> ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 1995.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília, DF, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução - RDC nº 162 de 11 de setembro de 2001**. Brasília, DF, 2001.

AIRES, C.P.; TABCHOURY, C.P.; DEL BEL CURY, A.A.; CURY, J.A. Effect of a lactose containing sweetener on root dentine demineralization *in situ*. **Caries Research**, v. 36, n.3, p. 167-169, 2002.

AIRES, C.P.; DEL BEL CURY, A.A.; TENUTA, L.M.; KLEIN, M.I.; KOO, H.; DUARTE, S.; CURY, J.A. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. **Caries Research**, v. 42, n.5, p. 380-386, 2008.

ALLWOOD, A.C.; WALTER, M.R.; KAMBER, B.S.; MARSHALL, C.P.; BURCH, I.W. Stromatolite reef from the Early Archaean era of Australia. **Nature**, v. 441, p. 714-718, 2006.

ALVES, D.; COSTA, A.L.; ALMEIRA, R.F.; CARVALHO, J.F.C.; FELINO, A. Cloreto de cetilpiridínio - revisão da literatura. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, v. 53, n.3, p. 181-189, 2012.

ALVES, L.A.; FREIRES, I.A.; DE CASTRO, R.D. Efeito antibacteriano de óleos essenciais sobre bactérias formadoras do biofilme dentário. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, p. 57-62, 2010.

AMBROSIO, S.R.; SCHORR, K.; DA COSTA, F.B. Terpenoids of *Viguiera arenaria* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 221-224, 2004.

ASADOORIAN, J. CDHA position paper on commercially available over-the-counter oral rinsing products. **Canadian Journal of Dental Hygiene**, v. 40, n. 4, p. 01-13, 2006.

AVILA, M.; OJCIUS, D.M.; YILMAZ, O. The oral microbiota: living with a permanent guest. **DNA and Cell Biology**, v. 28, n. 8, p. 405-411, 2009.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D. Biological effects essential oils: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BANAS, J. A. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. **Frontiers in Bioscience.**, v. 1, p.1267-1277, 2004.

BATISTA, A.C.; SILVA, T.A.; CHUN, J.H.; LARA, V.S. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. **Oral Diseases**, v. 8, n. 5, p. 254-260, 2002.

BOWEN, W.H. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? **Journal of American Dental Association**, v. 133, n. 10, p. 1405–1407, 2002.

BRIDIER, A.; BRIANDET, R.; THOMAS, V.; DUBOIS-BRISSENET, F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review, **Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 27, n.9, p. 1017-1032, 2011.

BRITTO, I.M.P.A.; CALIL, C.M.; MÜLLER, V.M.; PANNUTI, C.M.; PUSTIGLIONI, F.E. O uso de enxaguatórios bucais no controle da halitose. **Revista de Periodontia**, v. 19, n. 4, p. 61-67, 2009.

BURNE, R.A.; CHEN, Y.Y.; WEXLER, D.L.; KURAMITSU, H.; BOWEN, W.H. Cariogenicity of *Streptococcus mutans* strains with defects in fructan metabolism assessed in a program-fed specific-pathogen-free rat model. **Journal of Dental Research**, v.75, n. 8, p. 1572–1577, 1996.

BURNE, R.A. Oral streptococci: products of their environment. **Journal of Dental Research**, v. 77, p. 445-452, 1998.

BUSKÜHL, H. Avaliação *in vitro* do mecanismo de ação citotóxica de lactonas sesquiterpênicas e outras substâncias isoladas de *Vernonia scorpioides* (LAM) PERS. 2007. 114p. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2007.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. 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. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, 2002.

CARVALHO, TC. Avaliação do potencial antibacteriano de extratos brutos, frações e substâncias isoladas de *Miconia rubiginosa* e *Viguiera arenaria* frente à microrganismos causadores de infecções endodônticas. 2009. 89p. (Mestrado em Ciências) - Universidade de Franca, Franca, 2009.

CCAHUANA-VASQUEZ, R.A.; CURY, J.A. *S. mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. **Brazilian Oral Research**, v. 24, n. 2, p. 135-141, 2010.

CIANCIO, S.G. Mouthrinses can be an effective adjunct to mechanical cleaning in the fight against plaque. **Dimensions of Dental Hygiene**, v. 2, n.11, p. 24-29, 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**, 7<sup>a</sup> ed. Approved standard M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2006.

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n.3, p. 290-302, 2006.

CRAIG, R.G. **Restorative Dental Materials**. 9<sup>a</sup> ed. St. Louis: Mosby Year Book, p.141-147, 1993.

DAMGAARD, L. R.; NIELSEN, L. P.; REVSBECH, N. P. Methane microprofiles in a sewage biofilm determined with a microscale biosensor. **Water Research**, n.6, v. 35, p. 1379-1386, 2001.

DAWES, C.; TEN CATE, J.M. International symposium on fluorides: mechanisms of action and recommendation for use. **Journal of Dental Research**, v. 69, p. 505-836, 1990.

DAWIDOWICZ, A. L.; RADO, E.; WIANOWSKA, D. Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus vulgaris* L. **Talanta**, v. 76, n. 4, p. 878-884, 2008.

DESCHAMPS, C.; ZANATTA, J.L.; BIZOO, H.R.; OLIVEIRA, M.C.; ROSWALKA, L.C. Avaliação sazonal do rendimento do óleo essencial em espécies de menta. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 125-130, 2008.

DOOL, H.V.D.; KRATZ, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p. 463-471, 1963.

DUBOIS, M.; GILLIS, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

ELEY, B.M. Antibacterial agents in the control of supragingival plaque—a review. **Brazilian Dental Journal**, v. 186, p. 286–296, 1999.

FARDIN, R.F.; ANDRADE, I.P.; XAVIER, K.B.C.; NUNES, A.P.F. Avaliação *in vitro* das diferentes concentrações de clorexidina no controle da placa dental bacteriana. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, v. 13, n. 2, p. 37-42, 2011.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª ed. Parte II. São Paulo: Atheneu, 1988.

FERNANDES, R.P. Caracterização química, avaliação da toxicidade e atividade moluscida dos óleos essenciais da folha de *Pimenta dioica* Lindl, casca de *Citrus limon* Linneo e rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe. 2011. 130p. (Doutorado em Química Analítica) - Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Part III. Department of health and human services. 21 CFR. Part 356. **Oral health care drug products of over the counter human use; antigingivitis / antiplaque drug products**. Federal Register, v. 68, n.103, 2003.

GIANNELLI, M.; CHELLINI, F.; MARGHERI, M.; TONELLI, P.; TANI, A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. **Toxicology In Vitro**, v. 22, n. 2, p.308-317, 2008

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Products Reports**, v. 21, p. 263-277, 2004.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GODOI, A.P.T. Estudo do óleo essencial de *Casearia sylvestris* e da formulação de enxaguatório bucal. Caracterização química, potencial antimicrobiano e efeito nas propriedades dos materiais odontológicos estéticos. 2013. 210p. (Doutorado em Reabilitação

Oral) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

GOMES, D.A.A. Aplicação de microemulsões na solubilização de frações pesadas do petróleo. 2009. 90p. (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

GUIMARÃES, A.R.D.; PERES, M.A.; VIEIRA, R.S.; RAMOS-JORGE, M.L.; APOLINARIO, S.; DEBOM, A. Self-perception of side effects by adolescents in a chlorhexidine-fluoride-based preventive oral health program. **Journal of Applied Oral Science**, v.14, n.4, p.291-296, 2006.

HAMADA, S.; KOGA, T.; OOSHIMA, T. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. **Journal of Dental Research**, v, 63, n.3, p. 407-411, 1984.

HUANG, C.B.; ALIMOVA, Y.; MYERS, T.M.; EBERSOLE, J.L. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n. 7, p. 650–654, 2011.

ISCAN, G.; KIRIMER, N.; KÜRKCÜOĞLU, M.; BASER, H.C.; DEMIRCI, F. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, n.14, p. 3943-3946, 2002.

JASICKA-MISIAK, I.; LIPOK, J.; EWA, M.; WIECZOREK, P.M.; KAFARSKI, P. Antifungal activity of the carrot seed oil and its major sesquiterpene compounds. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.59, p.791-796, 2004.

JENKINSON, H.F.; LAMONT, R.J. Oral microbial communities in sickness and in health. **Trends in Microbiology**, v. 13, p. 589–595, 2005.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 813-829, 2003.

KARABAY, O.; SAHIN, I. *In vitro* activity of sodium-benzoate against isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **West Indian Medical Journal**, v. 54, n. 2, p. 107-109, 2005.

KARPANEN, T.J.; WORTHINGTON, T.; HENDRY, E.R.; CONWAY, B.R.; LAMBERT, P.A. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of

*Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 1031–1036, 2008.

KIVES, J.; ORGAZ, B.; SANJOSÉ, C. Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 52, n.2, p.123-127, 2006.

KLEIN, M.I.; DUARTE, S.; XIAO, J.; MITRA, S.; FOSTER, TH.; KOO, H. Structural and molecular basis of the role of starch and sucrose in *Streptococcus mutans* biofilms development. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n.3, p. 837–841, 2009.

KOLEMBRANDER, P.E.; WILLIAMS, B.L. Prevalence of viridians streptococci exhibiting lactose-inhibitable coaggregation with oral actinomycetes. **Infection and Immunity**, v.41, p.449-452, 1983.

KOO, H.; XIAO, J.; KLEIN, M.I. Extracellular polysaccharides matrix - an often forgotten virulence factor in oral biofilm research. **International Journal of Oral Sciences**, v. 1, n.4, p. 229–234, 2009.

KURAMITSU, H.K. Molecular genetic analysis of the virulence of oral bacterial pathogens: an historical perspective. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 14, n 5, p. 331–344, 2003.

LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 27, n. 1, p. 13-39, 2012.

LAWRENCE, M.J.; REES, G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, n.1, p. 89-121, 2000.

LEITÃO, D.P.S. Estudo comparativo do efeito *in vitro* do extrato bruto de própolis verde e extratos de *Baccharis dracunculifolia* sobre fatores de virulência de *Streptococcus mutans*, relacionados à cárie dental. 2005. 130p. (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

LEITÃO, D.P.S.; SILVA-FILHO, A.A.; POLIZELLO, A.C.M.; BASTOS, J.K.; SPADARO, A.C.C. Comparative evaluation of *in-vitro* effects of brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 1834-1839, 2004.

LEITE, M.F.; LEITÃO, D.P.S.; SOUSA, I.P.; CAMPOS, L.M.P.; POLIZELLO, A.C.M.; SOUSA, J.P.B.; BASTOS, J.K.; LOPEZ, R.F.V.; SPADARO, A.C.C. Alecrim-do-campo microemulsion mouthrinse: development, characterization and *in vitro* evaluation upon virulence factors of *S. mutans* associated with dental caries. In: *SINPOSPq* (Simpósio Internacional de Pós-Graduação e Pesquisa), Ribeirão Preto, 2008.

LEITE, M.F. Desenvolvimento e caracterização de microemulsões contendo extrato e óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* para enxaguatório bucal. 2009. 166p. (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

LEITES, A.; PINTO, C.B.R.; SOUSA, M.B.; DE SOUSA, E.R. Aspectos microbiológicos da cárie dental. *Salusvita*, v. 25, n. 2, p. 239-252, 2006.

LEMOS, J.A.; ABRANCHES, J.; BURNE, R.A. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. *Current Issues in Molecular Biology*, v. 7, n. 1, p. 95-107, 2005.

LEY, R.E.; LOZUPONE, C.A.; HAMADY, M.; KNIGHT, R.; GORDON, J.I. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, v. 6, p. 776–788, 2008.

LIMA, A.L.; VALENÇA, A.M.G.; ALBUQUERQUE, F.R.; SILVA, N.B. Análise do pH e da viscosidade nos enxaguatórios bucais fluoretados disponíveis comercialmente na cidade de João Pessoa-PB. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria Clínica Integrada*, v. 5, n. 3, p. 223-228, 2005.

LIMA, H.R.P.; KAPLAN, M.A.C.; CRUZ, A.M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. *Floresta e Ambiente*, v.10, n.2, p.71-77, 2003.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M.G.; MORAES, J.C.; CARVALHO, S.M.; MELO, B.A.; VIEIRA, S.S. Composição química e toxicidade de óleos essenciais para o pulgão-verde *Schizaphis graminum* (Rondani, 1852). *Arquivos do Instituto Biológico*, v.81, n.1, p. 22-29, 2014.

LIN, J.H.; LU, A.Y.H. role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. *Pharmacological Reviews*, v. 49, n. 4, p. 403-449, 1997.

LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiological Reviews*, v. 50, n. 4, p. 353-380, 1986.

MACÊDO, J.A.B. Biofilmes bacterianos, uma preocupação na indústria farmacêutica. **Revista Fármacos e Medicamentos**, v. 2, n. 7, p. 19-24, 2000.

MAGENTA, M.A.G. *Viguiera Kunth (Asteraceae, Heliantheae) na América do Sul e Sistemática das Espécies do Brasil*. 2006. 353p. (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MAH, T.C.; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001.

MARCOTTE H.; LAVOIE, M.C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 71-109, 1998.

MARINHO, B.V.S.; ARAÚJO, A.C.S. Uso dos enxagatórios bucais sobre a gengivite e biofilme dental. **International Journal of Dentistry**, v. 6, p. 124-132, 2007.

MARSH, P.D. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. **Journal of Dentistry**, v. 38, n.1, p. 11-15, 2010.

MARSH, P.D. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, n. 6, p. 7-15, 2005.

MARSH, P.D.; BRADSHAW, D.J. Physiological approaches to the control of oral biofilms. **Advances in Dental Research**, v. 11, n. 5A, p.1372-1377, 1997.

MARSH, P.D.; MOTER, A.; DEVINE, D.A. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. **Periodontology** 2000, v. 55,p. 2016–2035, 2011.

MARTINS, F.T.; SANTOS, M.H.; POLO, M.; BARBOSA, L.C.A. Variação química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., sob condições de cultivo. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1203-1209, 2006

MASCARENHAS, A.K. Inconclusive evidence to suggest that alcohol containing mouthwash increases the risk of oropharyngeal cancer. **Journal of Evidence-Based Dental Practice**, v. 4, p. 249-250, 2004.

MASON, T. L.; WASSERMAN, B. P. Inactivation of red beet betaglucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. **Phytochemistry**, v. 26, n. 8, p. 2197-2202, 1987.

MIGUEL, M. G. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 5, p. 291-312, 2010.

MIKKELSEN, H.; DUCK, Z.; LILLEY, K.S.; WELCH, M. Interrelationships between colonies, biofilms, and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 6, p. 2411-2416, 2007.

MILLEZI, A.F. Ação de óleos essenciais sobre biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. 2012. 112p. (Doutorado em Microbiologia de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MOHAMED HANAA, A.R.; SALLAM, Y.I.; EL-LEITHY, A.S.; ALY, S.E. Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as affected by drying methods. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 57, n. 2, p. 113-116, 2012.

MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, 2009. CD –ROM.

MOREIRA, A.C.A.; PEREIRA, M.H.Q.; PORTO, M.R.; ROCHA, L.A.P.; NASCIMENTO, B.C.; ANDRADE, P.M. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 8, p. 153-161, 2009.

MORONKOLA, O.D.; OGUNWANDE, I.A.; WALKER, T.M.; SETZER, W.; OYEWOLE, I.O. Identification of the main volatile compounds in the leaf and flower of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray. **Journal of Natural Medicines**, v. 61, p. 63-66, 2007.

NEWBRUN, E. **Cariologia**, 2ª ed. Santos:Columbia, p.17-42, 1988.

NOSTRO, A.; ROCCARO, A.S.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, M.A.; PIZZIMENTI, F.C.; CIONI, P.L.; PROCOPIO, F.; BLANCO, A.R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 519-523, 2007.

OLIVEIRA, T.S. Anatomia, germinação de sementes e análise do óleo essencial de *Viguiera arenaria* Baker in Martius e *Viguiera robusta* Gardner in Hook (Asteraceae-Heliantheae). 2011. 95p. (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development, **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p.49-79, 2000.

PATEL V.; KUKADIYA, H.; MASHRU, R.; SURTI, N.; MANDAL, S. Development of Microemulsion for Solubility Enhancement of Clopidogrel. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 4, p. 327-334, 2010.

PHILLIPS, R.W. **Materiais Dentários**. 9<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.

PITHON, M.M.; SANTOS, A.M.; FREITAS, L.M.A.; SOUZA, R.A.; SANTOS, R.L.; MARTINS, F.O.; ROMANOS, M.T.V. *In vitro* assessment of the cytotoxicity of mouthwashes with and without alcohol. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial**, v. 11, n. 1, p. 9-12, 2011.

PORTO, T.S.; FURTADO, N.A.J.C.; HELENO, V.C.G.; MARTINS, C.H.G.; DA COSTA, F.B.; SEVERIANO, M.E.; SILVA, A.N.; VENEZIANI, R.C.S. Antimicrobial ent-primarane diterpenes from *Viguiera arenaria* against Gram-positive bacteria. **Fitoterapia**, v. 80, p. 432-436, 2009.

QUIRYNEN, M.; SOERS, C.; DESNYDER, M.; DEKEYSER, C.; PAUWELS, M.; VAN STEENBERGHE, D.A.A. 0.05% cetyl pyridinium chloride/0.05% chlorhexidine mouthrinse during maintenance phase after initial periodontal therapy. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, p. 390-400, 2005.

RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors**, v. 12, p. 12347-12360, 2012.

REICHLING, J.; SCHNITZLER, P.; SUSCHKE, U.; SALLER, R. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties – an overview. **Forsch Komplementmed Journal**, v.16, p.79–90, 2009.

REN, D.; ZUO, R.; GONZALEZ BARRIOS, A.F.; ELDRIDGE, GR.; PASMORE, M.E.; WOOD, T.K. Differential gene expression for investigation of *Escherichia coli* biofilm inhibition by plant extract ursolic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 4022-4034, 2005.

RIBEIRO, S.K.; BUSSADORI, S.K. Comparação entre o gel de clorexidina e o verniz de flúor na contagem salivar de *Streptococcus mutans*. **Revista Paulista de Odontologia**, v. 22, n. 4, p. 48-52, 2000.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80-84, 2005.

ROSSI, C.G.F.T.; DANTAS, T.N.C.; NETO, A.A.D.; MACIEL, M.A.M. Microemulsões: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista Universidade Rural**. Série Ciências Exatas e da Terra, Seropédica, v. 26, n.1, p. 45-66, 2007.

SALEEM, M.; NAZIR, M.; ALI, M.S.; HUSSAIN, D.; LEE, Y.S.; RIAZA, N.; JABAR, A. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural Products Reports**, v. 27, p. 238-254, 2010.

SANTOS, C.O. Óleo essencial de *Mentha piperita* L.: uma breve revisão de literatura. 2011. 20p. (Trabalho de conclusão de curso em Farmácia) – Centro de Ciências Biológicas e da saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2011.

SCHILLING, E.E.; PANERO, J.L. A revised classification of subtribe Helianthinae (Asteraceae: Heliantheae) II. Derived lineages. **Botanical Journal of the Linnean Society**, n. 167, p. 311–331, 2011.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 6<sup>a</sup> ed. Florianópolis: UFRGS; UFSC, 2007.

SOUZA-GUGELMIN, M.C.M.; SILVA, F.W.G.P.; QUEIROZ, A.M.; AMARAL, T.H.A. Avaliação da atividade antimicrobiana de dentifrícios infantis: estudo *in vitro*. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, v. 47, n.3, p. 10-13, 2006.

TRAHAN, L. Xylitol: a review of its action on mutans streptococci and dental plaque – its clinical significance. **International Dental Journal**, v. 45, p. 77-92, 1995.

TRYGG, J.; HOLMES, E.; LUNDSTEDT, T. Chemometrics in metabolomics. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n.2, p.469-479, 2007.

TWENTYMAN, P.R.; LUSCOMBE, M.A. Study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. **British Journal of Cancer**, v. 56, n. 3, p. 279-285, 1987.

VAN DER OUDERAA, F.J.G. Anti-plaque agents. Rationale and prospects for prevention of gingivitis and periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 18, p. 447-454, 1991.

VITRAL, J.C.A.; SILVA, A.A.; SOUSA, M.A.; FERREIRA, A.P.; VITRAL, R.W.F. Avaliação da citotoxicidade de materiais odontológicos através do método de MTT e

produção de óxido nítrico: descrição de uma técnica. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 8, n. 3, p. 359-365, 2008.

VITTI A.M.; BRITO, J.O. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos Florestais**. ISSN 0103-4715, n. 17, p. 1-26, 2003.

WESTERGREN, G.; KRASSE, B. Evaluation of a micromethod for determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus infection*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 82-83, 1978.

WILSON M. *Microbial Inhabitants of Humans: Their Ecology and Role in Health and Disease*. Cambridge: Cambridge University Press, 2005.

YADEGARINIA, D.; GACHKAR, L.; REZAEI, M.B.; TAGHIZADEH, M.; ASTANEH, S.A.; RASOOLI, I. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. **Phytochemistry**, v. 67, n. 12, p. 1249-1255, 2006.

ZANATTA, F.B.; RÖSING, C.K. Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. **Scientific-A**, v. 1, n. 2, p. 35-43, 2007.

ZANIN, S.M.W.; MIGUEL, M.D.; BARREIRA, S.M.W.; NAKASHIMA, T.; CURY, C.D.; COSTA, C.K. Enxaguatório bucal: principais ativos e desenvolvimento de fórmula contendo extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. **Visão Acadêmica**, v. 8, n. 1, p. 19-24, 2007.