

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

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.

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.

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[®], 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^a 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^a 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^a 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 enxagatários 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^a 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^a 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.