



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LUIZIANA BARBOSA MOURA

**ESTUDO DO CRESCIMENTO BACTERIANO NA PRESENÇA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *Dysphania ambrosioides* L. e *Ocimum campechianum* Mill. PARA
AVALIAR SEUS POTENCIAIS COMO ANTISSÉPTICOS BUCAIS**

BELÉM

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LUIZIANA BARBOSA MOURA

**ESTUDO DO CRESCIMENTO BACTERIANO NA PRESENÇA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *Dysphania ambrosioides* L. e *Ocimum campechianum* Mill. PARA
AVALIAR SEUS POTENCIAIS COMO ANTISSÉPTICOS BUCAIS**

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de mestre em Biotecnologia pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

Orientador: Profº Dr. Alberdan Silva Santos

BELÉM

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Moura, Luiziana Barbosa, 1984-

Estudo do crescimento bacteriano na presença de óleos essenciais de *Dysphania ambrosioides* L. e *Ocimum campechianum* Mill. para avaliar seus potenciais como antissépticos bucais / Luiziana Barbosa Moura. - 2015.

Orientador: Alberdan Silva Santos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Belém, 2015.

1. Plantas medicinais. 2. Plantas aromáticas. 3. Essências e óleos essenciais. 4. Antissépticos bucais. 5. Agentes antiinfeciosos. I. Título.

CDD 22. ed. 581.634

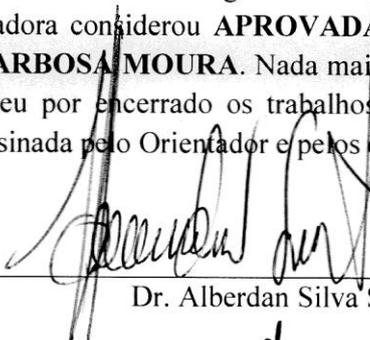


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ATA DA BANCA EXAMINADORA DO EXAME DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado EM BIOTECNOLOGIA APRESENTADO E DEFENDIDO PELA MESTRANDA LUIZIANA BARBOSA MOURA.

Aos trinta e um dias do mês de agosto de dois mil e quinze, às quatorze horas, reuniu-se na sala LM-08, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, a Banca Examinadora para julgar a defesa do Exame de Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, apresentado e defendido pela mestranda **LUIZIANA BARBOSA MOURA** e intitulado: “**ESTUDO DO CRESCIMENTO BACTERIANO NA PRESENÇA DE ÓLEOS ESSENCIAS DE *Chenopodium ambrosioides* L. e *Ocimum campechianum* Mill PARA AVALAIAR SEUS POTENCIAIS COMO ANTISSÉPTICOS BUCAIS.**”. A Banca Examinadora, organizada obedecendo ao disposto nas Resoluções do Conselho Superior de Ensino e Pós-Graduação, foi constituída pelos professores: Dr. Alberdan Silva Santos, na condição de Orientador (sem direito a voto) e pelos membros: Dr. Luis Adriano Santos Do Nascimento, Dra. Eloisa Helena De Aguiar Andrade e Dr. Antônio Sérgio Costa Carvalho. Após a mestranda haver apresentado os resultados de sua Dissertação, obedecendo ao prazo regimental, foi dada a palavra aos examinadores para arguição, tendo a mestranda respondido as perguntas formuladas. Logo após, reuniu-se a Banca Examinadora para proceder ao julgamento, sendo atribuídos os seguintes conceitos: Dr. Luis Adriano Santos Do Nascimento: APROVADA, Dra. Eloisa Helena De Aguiar Andrade: APROVADA e Dr. Antônio Sérgio Costa Carvalho: APROVADA. Assim sendo, a Banca Examinadora considerou **APROVADA** a Defesa de Dissertação da mestranda **LUIZIANA BARBOSA MOURA**. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Banca Examinadora deu por encerrado os trabalhos, e foi lavrada a presente Ata, que vai devidamente assinada pelo Orientador e pelos examinadores.

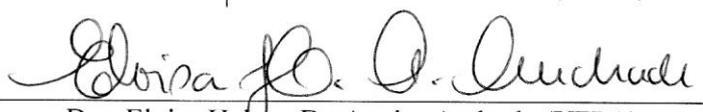
Belém, 31 de agosto de 2015.



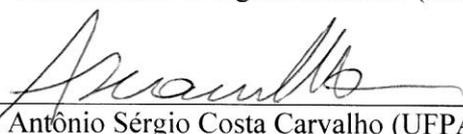
Dr. Alberdan Silva Santos (UFPA)



Dr. Luis Adriano Santos Do Nascimento (UFPA)



Dra. Eloisa Helena De Aguiar Andrade (UFPA)



Dr. Antônio Sérgio Costa Carvalho (UFPA)

Dedico

À minha preciosa e amada família. Aos meus pais, Darlindo e Lindalva, e meus irmãos, Danilo e Laíze. E ao meu querido companheiro Romário. Essenciais nos momentos em que mais necessito. Eles são os pilares de minha vida!

“Somos o resultado de nossas escolhas e das decisões que tomamos. Em nossas mãos está a felicidade ou o sofrimento. É certo que não podemos voltar no tempo e apagar o que foi feito. Mas sempre podemos começar de novo e fazer diferente.”

(São Francisco de Assis)

AGRADECIMENTO

Sobretudo, agradeço a Deus pela realização deste sonho.

Aos meus pais pela educação e formação como cidadã, pelos ensinamentos sobre a vida como um todo e pela dedicação e amor que recebi. Estarei sempre tentando retribuir... Mãe, pode se orgulhar! Pai, nós conseguimos! Aos meus irmãos pelo companheirismo e o laço fraterno inabalável. Somos um pelo outro, acima de nossas diferenças, unidos por este eterno amor! E ao Romário por todo apoio, incentivo e compreensão. Presente nos momentos mais belos e também nos mais tortuosos... Carinho, você adoça a minha vida!

Às minhas queridas amigas-irmãs, Gilda Helena Pimentel, Manoela Wariss e Girlaine Guedes, que estão ao meu lado nos momentos mais importantes.

Ao meu afilhado querido, Matheus Barbosa, por todo carinho a mim dedicado.

Ao meu orientador, o prof^o Dr. Alberdan Santos, por seus ensinamentos, paciência e compreensão. Sempre disposto a ajudar pelo bem da ciência. Um verdadeiro mestre!

Aos meus companheiros dos Laboratórios de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade molecular da Universidade Federal do Pará (LabISisBio). Principalmente à minha amiga, Márcia Gleice Souza, pela atenção e ensinamentos na prática laboratorial, além de uma amizade para toda a vida.

Ao meu amigo Adonis Lima, que me encorajou e mostrou o caminho para avançar na vida acadêmica.

Aos meus amigos da turma de mestrado, Victor Marinho, Rosana Corpes, Bruno Martinez, Cláudio Gibson, Adriana Loureiro, Laíza Mendes, Edineida Lopes, Cristóvão Pereira, Denise Freitas e John Eric Ferreira, presentes em momentos especiais desta jornada.

Ao Prof^o Dr^o Antônio Sérgio Carvalho pela amizade e pelo apoio nos LabISisBio.

Ao prof^o Dr^o Luiz Adriano pela amizade e pelo incentivo durante todo o curso.

Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia pela possibilidade de realizar este projeto.

À prof^a Eloísa Helena Andrade pelas contribuições.

À Universidade Federal do Pará, fundamental em minha formação acadêmica e profissional.

À FAPESPA pela concessão da bolsa.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

MOURA, Luiziana Barbosa. **ESTUDO DO CRESCIMENTO BACTERIANO NA PRESENÇA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Dysphania ambrosioides* L. e *Ocimum campechianum* Mill. PARA AVALIAR SEUS POTENCIAIS COMO ANTISSÉPTICOS BUCAIS**

Resumo:

As plantas aromáticas como *Dysphania ambrosioides* (mastruz) e *Ocimum campechianum* (alfavaca), que fazem parte da medicina popular no Brasil, apresentam substâncias fenilpropanoídicas e terpenoídicas em seus óleos essenciais como resultado do metabolismo secundário, o qual influencia na adaptação e defesa destas espécies no meio ambiente. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Dysphania ambrosioides* L. e *Ocimum campechianum* Mill. contra bactérias patogênicas bucais. Para isso foram utilizados os métodos de disco de difusão em Ágar e de microdiluição em caldo adaptado. As plantas foram obtidas no município de Santa Izabel do Pará, suas folhas foram lavadas e pesadas; o óleo essencial foi obtido por hidrodestilação. Anteriormente, os componentes dos óleos essenciais foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. As linhagens de bactérias utilizadas foram: *Lactobacillus casei* (ATCC 7469), *Lactobacillus fermentum* (ATCC 9338), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus oralis* (ATCC 10557) e *Agregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 29522). As suspensões bacterianas para os testes foram preparadas e padronizadas a 0,5 McFarland. Como controle positivo adotou-se o digluconato de clorexidina a 0,12%. Observaram-se halos de inibição para todas as amostras nas diferentes concentrações de cada óleo (1%, 5%, 10%, 25%, 50% e 75%). Os maiores halos foram encontrados para *A. actinomycetemcomitans*. No teste de microdiluição o óleo de alfavaca inibiu a bactéria *S. mutans*, principal fator etiológico da cárie, em concentração de 1%; o óleo de mastruz inibiu *L. casei*, microrganismo que potencializa o processo de cárie, em concentrações a partir de 10%; Ambos os óleos inibiram o crescimento de *A. actinomycetemcomitans*, e podem ser eficazes contra a doença periodontal provocada por esse patógeno. As espécies vegetais deste estudo produzem classes de metabólitos secundários com potenciais aplicações na formulação de produtos odontológicos.

Palavras-chaves: biofilme bucal, óleos essenciais, atividade antimicrobiana, *Dysphania ambrosioides*, *Ocimum campechianum*

ABSTRACT

MOURA, Luiziana Barbosa. GROWTH STUDY OF BACTERIA IN THE PRESENCE OF ESSENTIAL OILS *Dysphania ambrosioides* L. and *Ocimum campechianum* Mill TO EVALUATE ITS POTENTIAL AS MOUTH ANTISEPTIC.

ABSTRACT:

The aromatic plants like *Dysphania ambrosioides* (mastruz) and *Ocimum campechianum* (Alfavaca), that are part of folk medicine in Brazil, have phenylpropanoids and terpenoids compounds in their essential oils as result of secondary metabolism that influence the adaptation and defense of these species in environment; particularly, defense against microorganisms. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of essential oils of *D. ambrosioides* and *O. campechianum* against pathogenic bacteria mouth. For this they used the disk diffusion method on agar and broth microdilution adapted. The plants were obtained in Santa Izabel do Pará, their leaves were washed and weighed; the essential oil was obtained by hydrodistillation. After, the components of essential oils were identified by gas chromatography-mass spectrometry. Bacteria strains used were: *Lactobacillus casei* (ATCC 7469), *Lactobacillus fermentum* (ATCC 9338), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus oralis* (ATCC 10557) and *Agregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 29522). Bacterial suspensions were prepared for testing and 0.5 McFarland standard. As a positive control we adopted the digluconate of chlorhexidine 0.12%. Inhibition halos were observed for all samples in different concentrations of each essential oil (1%, 5%, 10%, 25%, 50% and 75%). The largest halos were found to *A. actinomycetemcomitans*. In the microdilution test the basil oil inhibited the bacteria *S. mutans*, the main etiological factor for caries in concentration of 1%; mastruz the oil inhibited *L. casei*, microorganism that enhances the process of decay in concentrations from 10%; Both oils inhibited the growth of *A. actinomycetemcomitans*, and can be effective against periodontal disease caused by that pathogen. Plant species of this study produce secondary metabolites classes with potential applications in the development of dental products.

Keywords: Oral biofilm, essential oils, antimicrobial activity, *Dysphania ambrosioides*, *Ocimum campechianum*

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Biofilme Bucal	16
Figura 02	Diagrama proposto para explicar os fatores etiológicos da cárie	20
Figura 03	Cavitações nos elementos dentários	21
Figura 04	Doença periodontal	22
Figura 05	Endorcadite infecciosa	22
Figura 06	<i>D.ambrosioides</i> (mastruz)	30
Figura 07	<i>O. campechianum</i> (alfavaca do campo) como planta ornamental	31
Figura 08	Sistema Clevenger modificado	37
Figura 09	Placa de CCD dos óleos essenciais	41
Figura 10	Perfil cromatográfico do óleo essencial de <i>D. ambrosioides</i>	43
Figura 11	Estruturas de substâncias majoritárias de <i>D. ambrosioides</i>	44
Figura 12	Perfil cromatográfico do óleo essencial de <i>O. campechianum</i>	46
Figura 13	Estruturas de substâncias majoritárias de <i>O. campechianum</i>	48
Figura 14	Avaliação da atividade antimicrobiana	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Bactérias relacionadas a doenças bucais	18
Tabela 02	Meios de cultura utilizados do cultivo de cada bactéria	38
Tabela 03	Composição do óleo essencial de <i>D. ambrosioides</i>	42
Tabela 04	Composição do óleo essencial de <i>O. campechianum</i>	45
Tabela 05	Testes de disco-difusão para o óleo essencial de <i>D. ambrosioides</i>	52
Tabela 06	Testes de disco-difusão para o óleo essencial de <i>O. campechianum</i>	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01	Inibição de <i>L. casei</i> frente aos óleos OEA e OEM	53
Gráfico 02	Inibição de <i>S. mutans</i> frente aos óleos OEA e OEM	54
Gráfico 03	Inibição de <i>S. sanguis</i> frente aos óleos OEA e OEM	55
Gráfico 04	Inibição de <i>L. fermentum</i> frente aos óleos OEA e OEM	56

LISTA DE ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
ICI	Índice de confiabilidade de identificação
IK	Índice Kovats
OEA	Óleo essencial de <i>O. campechianum</i> ou alfavaca
OEM	Óleo essencial de <i>D. ambrosioides</i> ou mastruz
UFC	Unidades formadoras de colônias
TR	Tempo de retenção

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	BIOFILME BUCAL.....	16
3.2	BACTÉRIAS BUCAIS PATOGÊNICAS.....	17
3.2.1.	<i>Streptococcus mutans</i>	18
3.2.2.	<i>Streptococcus sanguis</i>	19
3.2.3.	Lactobacilos	19
3.2.4.	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	19
3.3	INFECÇÕES BUCAIS.....	20
3.4	ANTISSÉPTICOS BUCAIS.....	23
3.5	FARMACOBOTÂNICA.....	24
3.6	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	26
3.7	<i>Dysphania ambrosioides</i> L.....	29
3.8	<i>Ocimum campechianum</i> Mill.....	31
3.9	PRODUTOS NATURAIS NA ODONTOLOGIA.....	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	MATERIAL BOTÂNICO.....	36
4.2	OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	36
4.3	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	37
4.4	CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	37
4.5	CEPAS BACTERIANAS.....	38
4.6	PREPARO DA SUSPENSÃO PARA OS ENSAIOS	39
4.7	MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO EM ÁGAR.....	39
4.8	MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO ADAPTADO.....	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	OBTENÇÃO DOS ÓLEOS OEA E OEM E IDENTIFICAÇÃO CROMATOGRÁFICA.....	40
5.1.1	Identificação da Composição do óleo essencial de <i>D. ambrosioides</i>	42
5.1.2	Identificação da Composição do óleo essencial de <i>O. campechianum</i>	45
5.2	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	49
5.3	INIBIÇÃO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS OEM E OEA	53
6	CONCLUSÃO	58
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são componentes voláteis resultantes do metabolismo secundário de plantas aromáticas formadas principalmente por monoterpenos e sesquiterpenos, além de derivados fenilpropanoídicos. Essas substâncias podem ser usadas na culinária, na indústria de perfumes, na indústria cosmética e na fitoterapia (CERQUEIRA et.al., 2007). Muitas plantas aromáticas são tidas como medicinais e o princípio ativo pode ser encontrado, principalmente nas folhas, troncos e raízes; algumas vezes nas cascas, flores e frutos de onde se obtém substâncias voláteis que formam os óleos essenciais ou aromas. Há tempos a Odontologia usufrui dos benefícios dos óleos essenciais e vêm avançando recentemente em estudos farmacobotânicos.

Dessa forma, diversos óleos essenciais são encontrados como participantes ativos nas fórmulas de alguns enxaguantes bucais (LEITE, 2009). Os dentifrícios também possuem produtos naturais em sua composição, seja para facilitar a limpeza das superfícies dentárias ou para uso terapêutico. Existem fios e fitas dentais envolvidos por óleos essenciais. Produtos para fins de higiene bucal podem conter óleos vegetais, os quais são empregados para algum benefício preventivo, curativo ou apenas para refrescar. O eucaliptol e o óleo de laranja são utilizados na clínica odontológica durante o retratamento de canal dentário.

A cavidade oral é um ambiente dinâmico em constante transformação, onde o desequilíbrio pode levar a diversos estados patológicos. Comumente, as afecções na região oral se instalam por um conjunto de fatores como: presença de bactérias patogênicas, predisposição do sistema imunológico do indivíduo e falta de higiene. No Brasil, a cárie é a infecção bucal de maior prevalência, pois muitas pessoas não têm acompanhamento odontológico. Dessa forma é importante introduzir no mercado, produtos de fácil acesso ao público em geral. E os produtos naturais são uma boa alternativa, diante da diversidade biológica amazônica.

Assim, este trabalho buscou obter óleos essenciais de espécies medicinais facilmente encontradas na região paraense, *Dysphania ambrosioides* L. e *Ocimum campechianum* Mill. O levantamento bibliográfico torna essas plantas sugestivas para a composição de um colutório. Para tanto, a técnica utilizada de extração dos óleos essenciais foi também a mais indicada, hidrodestilação por arraste a vapor. Simultaneamente ao estudo dos óleos essenciais, desenvolveu-se o cultivo das linhagens de patógenos bucais. A avaliação antimicrobiana foi realizada por disco-difusão em Ágar e teste de microdiluição em caldo adaptado.

A variação na constituição química desses óleos essenciais é influenciada por fatores

genéticos, além dos fatores ambientais que podem acarretar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários (MORAIS, 2009). Esses últimos fatores se devem comumente à eliciação provocada pelos agentes interferentes como patógenos, solo, influência solar. Assim, essências produzidas por plantas podem ser consideradas um mecanismo de defesa contra as bactérias e fungos (NOVACOSK e TORRES, 2006). Daí a importância de se pesquisar o potencial biológico das plantas aromáticas.

O uso de plantas em favor da humanidade remonta quase que à própria origem do ser humano. E com o surgimento de novas tecnologias, cresce a possibilidade da descoberta de novas biomoléculas que apresentem potencial de aplicação contra doenças diversas. Isso aumenta a possibilidade de novas alternativas para a melhoria da qualidade de vida das pessoas. Investigar a composição química de espécies vegetais é conhecer melhor o potencial metabolômico das plantas da Amazônia. E para aumentar a possibilidade de uso, o ideal é que, juntamente com os ensaios para verificação da atividade biológica, seja realizada a análise química do óleo essencial de modo planejado para que se possa obter a caracterização biomonitorada e se chegue aos princípios ativos na forma de frações ou de moléculas isoladas.

O uso medicinal das plantas, perpetuado por gerações nas regiões onde são cultivadas, auxilia como norteador da investigação científica, tendo como base a etnobotânica e etnofarmacologia. Além disso, para boa parte da população amazônica, a medicina alternativa ainda é a única opção de tratamento rápido. Nesse contexto, testes antimicrobianos tornam-se uma importante ferramenta no uso da atividade biológica de produtos do metabolismo secundário de plantas aromáticas em favor da busca de conhecimento para o combate de doenças da boca.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar o potencial antimicrobiano de óleos essenciais das plantas aromáticas das espécies *Dysphania ambrosioides* L. e *Ocimum campechianum* Mill. frente a patógenos da cavidade oral.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Obter óleos essenciais das espécies *Dysphania ambrosioides* L. e *Ocimum campechianum* Mill.;
2. Avaliar a composição química dos óleos essenciais extraídos das plantas coletadas;
3. Cultivar bactérias patogênicas à cavidade bucal para realizar os ensaios com os óleos essenciais;
4. Realizar testes antimicrobianos *in vitro* com os óleos essenciais utilizando duas técnicas, o método de disco-difusão em Ágar e um método de microdiluição em caldo adaptado.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 BIOFILME BUCAL

O habitat da cavidade oral é formado pelo epitélio bucal, dorso da língua, superfície supragengival, superfície subgengival e epitélio do sulco gengival. Este ecossistema abriga cerca de 500 espécies de microrganismos. Estima-se a quantidade de mais de mil bactérias em 1g de biofilme dental. E participam da ecologia oral microrganismos anaeróbios, aeróbios, facultativos e microaerofílicos (IULIANA, BRIQUES, 2003). Assim, cavidade oral humana é um sistema com transporte contínuo de bactérias. A boca, com suas condições ideais de crescimento para microrganismos, possui muitos nichos que podem ser colonizados, mas para causar infecção ou sobreviver na cavidade bucal, esses microrganismos precisam aderir a superfícies (QUIRYNEN & VOGELS, 2002).

O termo biofilme é empregado para designar comunidades de microrganismos aderidas sobre uma superfície e sob a ação contínua de um fluxo salivar. A formação do biofilme bucal (FIG.1) pode ser considerada a etapa inicial no desenvolvimento da doença cárie, assim como de infecções periodontais (BARBIERI, 2005). As bactérias se acumulam por coagregação com a mesma espécie ou com outras espécies, utilizando mecanismos e estruturas como glicocálice, adesinas, fímbria, além da produção de matriz polissacarídica extracelular (JORGE, 1998; KOLENBRANDER, 2000).

Figura 01. Biofilme dental evidenciado



Disponível em :<[http:// projectosaudeoral.webnode.pt/dentes/doen%C3%A7as/](http://projectosaudeoral.webnode.pt/dentes/doen%C3%A7as/)>. Acesso em: 20 de abr. 2013.

O desenvolvimento do biofilme dental é um processo no qual a transição entre um estado inicial e outro é feita de maneira controlada e é altamente especializada sob o ponto de vista fisiológico, bioquímico e molecular (O'TOOLE, KAPLAN, KOLTER, 2000). Portanto, a formação do biofilme na superfície dental é um fenômeno complexo, e possivelmente a chave para o esclarecimento das patologias bucais de origem bacteriana. O entendimento preciso da formação e virulência desse biofilme em função do tempo, dos fatores

imunológicos, dos fatores microbianos, entre outros, tem sido investigado por muitos autores, e vem sendo gradativamente esclarecido (MONTANARO et. al., 2004).

O biofilme garante a vida da colônia em ambientes não estáveis, com fluxo constante de líquidos. Uma série de vantagens podem ser atribuídas à colônia, como melhor interação entre as células, facilitando as atividades bioquímicas, melhor proliferação, acesso a nichos e recursos que não poderiam ser utilizados por células isoladas, inclusive a defesa coletiva (BURNET, SCHERP, SCHUSTE, 1978).

A placa bacteriana é uma massa densa, não calcificada, constituída por microrganismos envolvidos numa matriz rica em polissacarídeos extracelulares bacterianos e glicoproteínas salivares, firmemente aderida aos dentes, cálculos e outras superfícies da cavidade bucal. Na maioria das vezes a placa se desenvolve sobre a película adquirida, que é um biofilme derivado da saliva que reveste toda a cavidade bucal. Dependendo da qualidade e da quantidade de microrganismos, essa placa bacteriana pode se tornar maléfica a cavidade oral, sendo indispensável a sua remoção diária para a promoção da saúde bucal (LASCALA, 1997).

3.2 BACTÉRIAS BUCAIS PATOGÊNICAS

O biofilme constitui-se de depósitos bacterianos e constituintes salivares, com um crescimento contínuo, por isso é considerado a principal causa da cárie, doença periodontal, infecções periimplantares e estomatites (ROSAN; LAMONT, 2000). O envolvimento de microrganismos na etiologia dessas doenças está bem estabelecido, porém não há a completa identificação de todos agentes microbianos envolvidos, sendo que diversas espécies de bactérias podem estar relacionadas a doenças bucais (tabela 01). Para que uma doença bucal se instale deve haver o desequilíbrio nesse ecossistema, pois sempre vai existir um biofilme. O desenvolvimento da doença é que vai depender dos cuidados do indivíduo ou do seu sistema imunológico (MOORE; MOORE, 1994).

As reações inflamatórias bucais podem ocasionar a difusão de microrganismos bucais para outras regiões do corpo do hospedeiro, as quais podem iniciar ou manter eventos inflamatórios em tecidos distantes. Essa disseminação dos microrganismos e seus produtos pode ocorrer pela penetração direta em tecidos mais profundos, através dos planos faciais, ossos, vasos sanguíneos, linfáticos, nervos ou pela superfície de glândulas salivares (MÁRTON, 2004).

Tabela 01: Bactérias relacionadas a doenças bucais

Bactérias	Doença	Referências
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Periodontite	Loesche; Syed, 1978
<i>Actinomyces israelii</i>	Cárie de superfície radicular	Shen et al., 2004
<i>Actinomyces naeslundii</i>	Gengivite	Paik et al., 2005
<i>Actinomyces viscosus</i>	Gengivite	Lindhe, 1999
<i>Bacteroides forsythus</i> ,	Periodontite	Loesche; syed, 1978
<i>Campylobacter spp.</i>	Gengivite e periodontite	Lindhe, 1999
<i>Eikenella corrodens</i> ,	Periodontite	Loesche; Syed, 1978
<i>Eubacterium spp.</i>	Periodontite	Loesche; Syed, 1978
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Gengivite e periodontite	Loesche; Syed, 1978
<i>Haemophilus</i>	Gengivite	Lindhe, 1999
Lactobacilos	Cárie	Uzeda, 2002
<i>Peptostreptococcus micros</i>	Gengivite	Lindhe, 1999
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Periodontite	Loesche; Syed, 1978
<i>Prevotella intermédia</i>	Gengivite e periodontite	Loesche; Syed, 1978
<i>Streptococcus Mutans</i>	Cárie	Hamada, 1986
<i>Streptococcus sobrinus</i>	Cárie	Hamada, 1986
<i>Streptococcus sanguis</i>	Cárie	Paik et al., 2005
<i>Treponema</i>	Periodontite	Loesche; Syed, 1978
<i>Veillonella parvula</i>	Gengivite	Lindhe, 1999

3.2.1 *Streptococcus mutans*

A espécie *S. mutans* é considerada o microrganismo mais cariogênico de todos os estreptococos orais. Adere à superfície dos dentes e subsiste sobre um grupo diverso de hidratos de carbono, enquanto metabolizam açúcar e outras fontes de energia, produzindo ácidos que provocam cavitações nos dentes. Depois de ter sido isolado de uma lesão de cárie pela primeira vez, em 1924, por Clark, ficou esquecido até 1960 (AJDIĆ et al., 2002). Na década de 60, o desenvolvimento de pesquisas com animais estimulou estudos a respeito da microbiologia da cárie dental, em que a bactéria foi convincentemente conectada à etiologia da doença (HAMADA, 1986).

3.2.2 *Streptococcus sanguis*

S. sanguis, um membro do grupo viridans de estreptococos, é uma bactéria Gram-positiva e aeróbia facultativa que habita normalmente a boca humana saudável, sendo comumente encontrado na placa dental, onde torna o ambiente menos hospitaleiro para outras espécies de estreptococos que causam cavidades, tais como *S. mutans* (PAIK et al., 2005). É um dos colonizadores pioneiros das superfícies dentárias, sendo algumas vezes o principal responsável pelas lesões cariosas nas fissuras dentais. Já foi isolado do biofilme dental, língua, canal radicular, lesões periapicais e pode causar endocardite infecciosa (CARNEIRO et al., 2008).

3.2.3 Lactobacilos

As bactérias do gênero *Lactobacillus* são bastonetes Gram-positivos, anaeróbios facultativos, um grupo de organismos que tem um papel mais importante na progressão do que na instalação da cárie dental. Uma característica importante é a sua capacidade acidogênica (produzir ácido) e acidúrica (sobreviver no meio ácido) e sua capacidade de realizar tanto o metabolismo oxidativo como fermentativo (LEITES, PINTO, SOUZA, 2006). A espécie *L. casei* é homofermentativa, produz ácido láctico. Já as espécies heterofermentativas, produzem vários ácidos orgânicos (ácido acético, ácido láctico) além do etanol e dióxido de carbono, como por exemplo, a espécie *L. fermentum* (UZEDA, 2002). Por serem acidogênicos, os lactobacilos conseguem potencializar a virulência dos estreptococos do grupo *mutans* (BRAILSFORD et al., 2001).

3.2.4 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

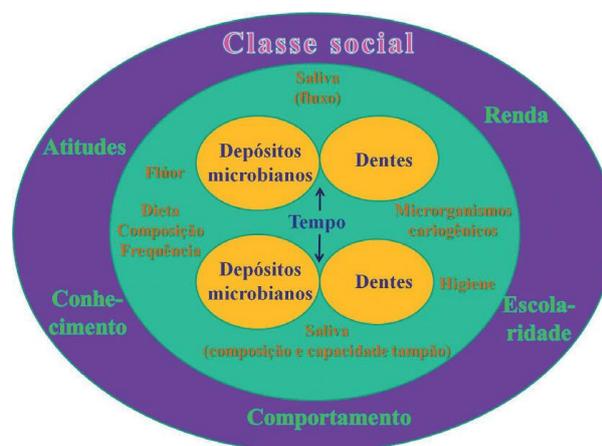
A. actinomycetemcomitans é frequentemente encontrado em culturas do periodonto humano, um bastonete Gram-negativo, pequeno, não formador de esporo, imóvel, anaeróbio facultativo. Esta bactéria tem sido fortemente associada à etiologia da periodontite juvenil localizada, entretanto, pode estar associada às mais variadas patologias de tecidos moles da boca (CORTELLI, CORTELLI, JORGE, 2001). Juntamente com *Prevotella intermédia* e *Porphyromonas gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* são os agentes patogênicos mais frequentemente relacionados às lesões periodontais (ETO, RASLAN, CORTELLI, 2003).

3.3 INFECÇÕES BUCAIS

O descuido relacionado à higiene pode levar a graves consequências para a saúde. Para não sermos prejudicados no bom desempenho de nossas funções orgânicas é muito importante o cuidado com a higiene oral, pois essa é a principal forma de prevenção dos problemas bucais. A cárie, além de ser uma das doenças infecciosas e transmissíveis mais prevalentes em humanos, é também uma das mais dispendiosas, no que tange ao tratamento sintomático restaurador. Sendo marcante a necessidade de instituição de medidas preventivas com o objetivo de controlar os fatores etiológicos da cárie dental (MOREIRA, 2006).

A lesão cariosa é considerada a manifestação de um processo patológico que ocorre em consequência de uma interação entre bactérias presentes na boca, superfícies dentais e constituintes da dieta, especialmente a sacarose, ou seja, a progressão da doença cárie depende de hospedeiro suscetível, microbiota patogênica e dieta rica em carboidratos, interagindo em condições críticas num determinado período de tempo (Figura 02). Através do consumo excessivo de carboidratos, o meio se torna propício e adequado à formação de ácido pelo metabolismo microbiano, que pode levar a cavitações nos elementos dentários (Figura 03) (PETTI & HAUSEN, 2000). Trata-se, portanto, de uma doença multifatorial, infecciosa e transmissível, associada à presença bacteriana na colonização de superfícies dentais. Devido à sua origem microbiana, pode variar de intensidade e prevalência de acordo com as condições de cada hospedeiro, onde fatores endógenos, como o fluxo e a capacidade tampão da saliva, presença de imunoglobulinas salivares e fatores exógenos, como a dieta e higiene bucal, interagem para estabelecimento da doença (BARBIERI, 2005; MOREIRA, 2006).

Figura 02: fatores etiológicos determinantes (círculo interno) e modificadores (círculo externo) da doença cárie.



Fonte: Manji & Fejerskov (1990)

Os estreptococos do grupo *mutans* têm sido encontrados em praticamente todos os indivíduos com alta, baixa ou muito baixa prevalência de cárie (CARLSSON, OLSSON & BRATTHALL, 1985). Porém, a simples detecção destes microrganismos na saliva ou biofilme não justifica o desenvolvimento de cavitação no dente, devendo-se levar em consideração a concepção da natureza multifatorial da doença, a qual apresenta variações de acordo com as condições socioeconômicas, culturais e ambientais de uma população (MATTOS-GRANER et al., 2001).

Figura 03. Cavitações nos elementos dentários



Fonte: <[http:// projectosaudeoral.webnode.pt/dentes/doen%C3%A7as/](http://projectosaudeoral.webnode.pt/dentes/doen%C3%A7as/)>.
Acesso em: 20 de abr. 2013.

Outro problema comum que afeta grande parte da população é a halitose. A maioria dos casos origina-se na cavidade oral, como resultado da putrefação de restos alimentares ou metabolismo bacteriano (RIO, NICOLA, TEIXEIRA, 2007). O mau cheiro geralmente está associado aos gases produzidos pelos compostos voláteis de enxofre resultante da fermentação bacteriana. A halitose pode ser fisiológica ou patológica. A primeira é causada, principalmente, por saburra lingual e má higiene bucal. Já a patológica resulta basicamente, de doença periodontal inflamatória crônica. O tratamento consiste em cuidados periodontais básicos, como raspagem e profilaxia, tratamentos restauradores dos elementos dentários e instrução de higiene bucal (FABER, 2009).

Uma gengiva de aspecto edemaciado, hiperplásica, de contorno alterado, mais espessa e sensível ao toque são sinais de doença periodontal (FIG. 4). O principal agente desencadeante dessa patologia é a placa bacteriana (SOARES et. al., 2009). Nos casos em que o desequilíbrio entre a ação microbiana e a resposta do hospedeiro perdurar, haverá evolução do quadro para periodontite, ou seja, agora com comprometimento ósseo (PERUZZO, 2005).

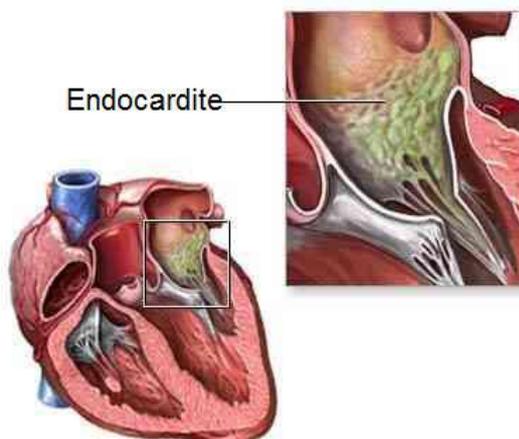
Figura 04: Doença periodontal.



Disponível em :<[http:// projectosaudeoral.webnode.pt/dentes/doen%C3%A7as/](http://projectosaudeoral.webnode.pt/dentes/doen%C3%A7as/)>.
Acesso em: 20 de abr. 2013.

Microrganismos que se originaram na cavidade oral podem adentrar a circulação sanguínea e provocar endocardite infecciosa (Figura 5). Endocardite é a inflamação da camada interna do coração, o endocárdio. Essa patologia compreende diversos agentes etiológicos dentre vírus, fungos e bactérias, mas a forma bacteriana é certamente a de maior incidência (PACHECO, 2011).

Figura 05. Endocardite infecciosa



Fonte: < <http://www.mdsauade.com/2009/08/endocardite.html>>.
Acesso em: 20 de abr. 2013

3.4 ANTISSÉPTICOS BUCAIS

Um bom antisséptico bucal possui propriedade germicida potente e letal em baixa concentração, deve ser estável e não se tornar inativo por células do organismo, líquidos orgânicos das infecções, além de ter baixa tensão superficial para ser absorvido pela mucosa bucal sem causar toxicidade e possibilitar uso prolongado sem causar danos teciduais ou hipersensibilidade (BURNET, SCHERP, SCHUSTE, 1978). No Brasil, os enxaguantes bucais são tidos como produtos de higiene pessoal e cosméticos, sendo as formulações indicadas para combater o biofilme patogênico (BUGNO et al.; 2004).

Mota et.al. (2004) compararam a eficácia de dois enxaguatórios bucais, Listerine® (Pfizer) e Cepacol® (Aventis Pharma), na redução da formação da placa bacteriana supragengival. De acordo com os resultados obtidos, Cepacol® e Listerine® não apresentaram diferenças entre si, estatisticamente significativas, quanto ao índice gengival. Porém, ao analisar-se o índice de placa, a marca comercial Listerine® apresentou melhor performance quando comparada à marca Cepacol®.

A clorexidina apresenta alta substantividade, tem a capacidade de permanecer ativa até 12 horas. Mas, apesar de ser a substância química mais utilizada atualmente em Odontologia para o controle do biofilme bacteriano, a solução de digluconato de clorexidina possui efeitos indesejáveis, como a pigmentação dental, manchamento de restaurações, alteração do paladar e queimação na língua. Dessa forma introdução de novos antimicrobianos desprovidos desses efeitos colaterais para serem utilizados como ferramenta odontológica é muito importante (SILVA, 2009).

Os agentes antimicrobianos distribuídos por pastas de dentes, géis, enxaguantes bucais e outros veículos podem auxiliar no controle da formação da placa bacteriana supragengival e na prevenção da doença periodontal. Para que um agente antimicrobiano tenha uma ação efetiva ele deve ser formulado em um veículo compatível quimicamente para que ocorra sua adequada liberação. Deve apresentar também substantividade, ou seja, continuar atuando num tempo apreciável mesmo após uso tópico, para que haja adesão aos sítios receptores, de onde poderá ser dissociado na sua forma biologicamente ativa. O uso desses agentes oferece inúmeras opções terapêuticas, deve-se a alternativa de aplicação de antissépticos como coadjuvantes da terapia mecânica (MOREIRA et. al, 2001).

A avaliação da eficácia de colutórios pode ser determinada por testes *in vitro* e *in vivo*. As diferenças verificadas entre esses métodos de avaliação podem estar relacionadas às características de adsorção dos agentes antimicrobianos e à menor sensibilidade aos

antimicrobianos observada em biofilmes em comparação a situações em que os microrganismos estão em suspensão. Os testes *in vitro* são de extrema importância como avaliação preliminar da eficácia de enxaguatórios bucais (BUGNO et al.; 2004).

3.5 FARMACOBOTÂNICA

As plantas têm sido desde a antiguidade, um recurso ao alcance do ser humano. Até nas sociedades mais industrializadas, o uso de vegetais *in natura* pela população vem se intensificando (MIGUEL e MIGUEL, 1999). As substâncias naturais, produzidas pelas espécies vegetais, têm atraído pesquisadores de diversas áreas. Nos países em desenvolvimento cerca de dois terços da população utiliza plantas como fonte de fármacos sem nenhum embasamento científico, prática esta que pode dar origem a intoxicações agudas ou crônicas. Daí também, a grande necessidade de estudos sobre as plantas medicinais (HARVEY, 2000).

Países como Cuba, Índia, México, Jordânia e Brasil intensificaram o número de trabalhos científicos que comprovam a ação antimicrobiana de diversas substâncias extraídas das plantas nativas. Na Índia, África e países da América Latina, os trabalhos se baseiam nas espécies mais utilizadas pela população, outros mantêm programas de triagem, como é o caso de Cuba, Honduras, México e Brasil (DUARTE, 2006).

A Farmacognosia é a ciência que trata da história, do tratamento, da conservação, da identificação, da avaliação e do emprego da droga. Trata também da seleção, cultura e colheita de plantas destinadas a produzir drogas, bem como da seleção e criação de animais. A Farmacobotânica se preocupa exclusivamente com as matérias de origem vegetal (OLIVEIRA e AKISUE, 2009).

Etnobiologia é a disciplina que estuda o complexo conjunto de relações de plantas e animais com sociedades humanas, presentes ou passadas. A Etnofarmacologia é a parte da etnobiologia que trata do conhecimento popular relacionado a sistemas tradicionais de medicina e não de superstições como pensam algumas pessoas. O conhecimento popular surge do intelecto da humanidade, para tirar proveito dele é preciso respeitá-lo. Pode se definir Etnofarmacologia de forma mais completa como "a exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem" (ELISABETSKY, 2003).

Fitofármacos são fármacos que utilizam como matéria-prima os produtos naturais isolados de extratos vegetais. Enquanto os fitoterápicos são aqueles constituídos

exclusivamente de matéria-prima vegetal, pois não se considera fitoterápico aquele que contenha substâncias ativas isoladas de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (LEITE, 2009). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) do Ministério da Saúde editou norma federal para disciplinar o registro e a comercialização de produtos fitoterápicos no Brasil, através da portaria SVS nº 116, substituída posteriormente pela resolução RDC nº 48 (BRASIL, 2004).

Em levantamento realizado pelo Ministério da Saúde no ano de 2005 em todos os municípios brasileiros, verificou-se que a Fitoterapia está presente em 116 municípios, contemplando 22 unidades federadas. Atualmente a aplicação de plantas medicinais no tratamento de doenças está legalizada e participa do Sistema Único de Saúde, sendo possível a sua inclusão médica e odontológica (BRASIL, 2006).

Considerando o cenário mundial, as indústrias farmacêuticas brasileiras pouco investem em pesquisa e extensão. A maioria da produção de fitoterápicos está baseada na consagração do uso popular dessas plantas. Assim, a indústria de fitoterápicos deverá se adaptar ao dinamismo do mercado internacional para não sofrer retaliações futuras. No mercado existem muitos fitoterápicos disponíveis, mas que precisam de algumas etapas avaliativas para se destacarem ou se tornarem mais confiáveis ao consumo (SIMÕES & SCHENKEL, 2002).

Contudo, no Brasil, a investigação sobre produtos naturais com atividade antimicrobiana também aumentou significativamente nos últimos anos. Até 2006 consideravam-se dados sobre 44 espécies de plantas pertencentes a 20 famílias com atividade positiva, incluindo espécies nativas e exóticas. O baixo número de registros pode ser consequência da disseminação restrita dos resultados de pesquisa, geralmente apresentados em eventos científicos locais ou regionais (DUARTE, 2006).

A biodiversidade da floresta amazônica é a maior do planeta, despertando interesse em todas as partes do mundo e muitos alegam que essa riqueza natural pertence a toda humanidade e não só às fronteiras dos países nos quais a Amazônia se encontra. Existe uma abundância de espécies vegetais desconhecidas tanto química quanto taxonomicamente, pois muitas nunca foram objeto de estudo. Assim, estudos que possibilitem traçar o perfil químico, toxicológico e farmacológico de exemplares dessa riqueza biológica são cada vez mais necessários (BALANDRIN et al., 1985).

3.6 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais das plantas aromáticas são complexos naturais possuidores de moléculas voláteis e odoríferas, sintetizadas graças à energia solar pelas células secretoras das plantas aromáticas, e se apresentam como uma substância líquida e oleosa. São muito utilizados na indústria cosmética, na perfumaria e na aromaterapia. Indústrias estão pesquisando os óleos essenciais como fontes alternativas, mais naturais e menos nocivas ao meio ambiente, além de ser um mecanismo de aproximação de insetos e pássaros polinizadores, ajudando na reprodução. A volatilização das essências da superfície das plantas pode ser considerada um mecanismo de defesa contra as bactérias e fungos (NOVACOSK e TORRES, 2006).

Assim, óleos essenciais geralmente apresentam atividade antimicrobiana contra um grande número de microrganismos incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos, podendo apresentar ação tanto contra bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas e ainda leveduras e fungos filamentosos (SOARES e CURY, 2001). Isso está intimamente relacionado a determinados componentes químicos desses óleos, os quais serão produzidos pelo metabolismo secundário do vegetal, portanto, de acordo com a necessidade da espécie no meio ambiente. Dessa forma, a combinação química dos compostos voláteis dependerá do clima, da estação do ano, condições geográficas, período de colheita e a técnica de destilação (SIMÕES e SHENKEL, 2004).

Grande parte das propriedades anti-sépticas dos óleos essenciais é atribuída a sua constituição química em fenóis, aldeídos e alcoóis. Algumas das moléculas antibacterianas desses óleos consideradas mais potentes são carvacrol, timol, eugenol, geraniol, linalol, terpineol e mentol. A química é complexa, mas geralmente os mais ativos apresentam grupos funcionais como alcoóis, fenóis, ésteres, ácidos e aldeídos, dentre outros. Essa toxicidade dos óleos essenciais sobre os microrganismos justifica suas ações bactericidas e bacteriostáticas. E para serem considerados bons para o consumo devem ser feitas uma série de avaliações quanto a sua toxicidade. A desconfiança em volta de produtos sintéticos vem crescendo e os produtos naturais estão em alta. Fazendo-se necessária uma série de cuidados para o uso correto dos extratos de plantas, principalmente no que diz respeito a óleo essencial, cujo uma gota pode conter quantidade demasiada de um princípio ativo (NOVACOSK e TORRES, 2006).

Essa mistura complexa de substâncias pode ser encontrada nas flores como no jasmim e na rosa; nas folhas como no eucalipto e no capim-limão; nos frutos como na laranja e no

limão; no lenho como na cabreúva e no pau-rosa; nas sementes, como na erva-doce; e nas raízes como no vetiver e na angélica, ou em todas as partes da planta, como no gerânio e na menta. Dentre as principais plantas aromáticas cultivadas no Brasil podemos citar: hortelã (*Mentha spicata*), hortelã-pimenta (*Mentha x piperita*), menta japonesa (*M. arvensis*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), erva-cidreira (*Melissa officinalis*), citronela (*Cymbopogon nardus*), palmarosa (*Cymbopogon martinii*), eucalipto (*Eucalyptus sp.*), vetiver (*Chrysopogon zizanioides*), pau-rosa (*Aniba rosaeodora*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), sassafrás (*Sassafras*) e cabreúva (*Myroxylon peruiferum*). (KOKETSU e GONÇALVES, 1991).

Segundo Morais (2009), os estímulos decorrentes do ambiente, no qual a planta se encontra, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos. Assim, a composição química dos óleos essenciais não é determinada apenas por fatores genéticos, outros tipos de fatores podem acarretar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários. Dentre eles, podem-se destacar as interações entre as plantas e os insetos, idade e estágio de desenvolvimento vegetal e fatores abióticos como luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de coleta, bem como técnicas de colheita e pós – colheita. É válido ressaltar que estes fatores podem apresentar correlações entre si, não atuando isoladamente, podendo exercer influência conjunta no metabolismo secundário. Portanto a alteração dos compostos majoritários nos óleos essenciais, seja por fatores genéticos, técnicos (coleta, estabilização e armazenamento), bióticos ou abióticos, pode influenciar diretamente na qualidade e, conseqüentemente, nos resultados de tratamentos e de testes biológicos com patógenos humanos ou fitopatógenos.

Os óleos essenciais são compostos químicos voláteis, salvo exceções, menos densos e mais viscosos que a água à temperatura ambiente. Podem ser extraídos a partir de uma grande variedade de plantas, sendo normalmente encontrados, em baixas concentrações, em glândulas especiais da planta, denominadas tricomas. Suas principais características são sua fragrância e suas atividades antimicrobianas e antioxidantes, por isso são largamente utilizados em indústrias de perfume, fábricas de aditivos naturais para aromatizar alimentos indústrias farmacêuticas e na indústria de cosméticos (NAVARRETE et al., 2011).

O ressurgimento do interesse nas terapias naturais e o crescimento da demanda de consumo por produtos naturais efetivos e seguros requerem mais dados sobre os óleos e extratos de plantas. Vários estudos têm apontado algumas propriedades terapêuticas dos óleos, destacando as seguintes: antiviral, antiespasmódica, analgésica, antimicrobiana, cicatrizante, expectorante, relaxante, anti-séptica das vias respiratórias, larvicida, vermífuga e antiinflamatória (NASCIMENTO et al., 2009).

Existem vários métodos descritos na literatura, propostos para mensurar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. Entretanto, as pesquisas sobre essa atividade têm sido prejudicadas pela ausência de métodos padronizados, o que dificulta a comparação entre os estudos além de inviabilizar sua reprodutibilidade. Os métodos diferem largamente e fatores importantes que influenciam os resultados são frequentemente negligenciados. Importa, portanto, mencionar o número da linhagem do microrganismo testado, o tempo de exposição do microrganismo ao óleo, a utilização de controles positivos e negativos, o uso e a quantidade de emulsificador, a composição do óleo e a descrição precisa das condições em que foi obtido. Sem padronização é praticamente impossível elucidar a verdadeira bioatividade, o potencial terapêutico e a utilidade clínica dos óleos essenciais, bem como fazer uma comparação direta entre eles (KOKETSO e GONÇALVES, 1991; NASCIMENTO et. al., 2007).

Os óleos essenciais são frequentemente extraídos das partes vegetais através dos métodos de arraste a vapor d' água, hidrodestilação ou expressão de pericarpo de frutos cítricos, porém há outras maneiras de extração como a enfleurage ou enfloração e extração por CO supercrítico, esta última muito utilizada na indústria (MORAIS, 2009).

Duarte (2006) estudou a atividade antimicrobiana de 80 espécies da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Unicamp, na forma de extratos etanólicos e óleos essenciais, para diversas bactérias patogênicas e para a levedura *C. albicans*. Os resultados apontaram que 11 espécies de plantas medicinais utilizadas na medicina popular brasileira apresentaram atividade antimicrobiana, sendo que os óleos das espécies estudadas inibiram a maioria dos microrganismos estudados. Os extratos de *Mikania glomerata* e *M. laevigata* apresentaram forte atividade para *S. aureus*. Este estudo confirma a importância da triagem de plantas bioativas. A atividade antimicrobiana foi atribuída aos compostos fenólicos.

Barbosa (2008) ao analisar a fração volátil dos frutos de jenipapo, mostrou predominância de ácidos graxos e de seus ésteres metílicos correspondentes. Os constituintes majoritários foram os ácidos octanóico e hexanóico, heptadienal, nonanol e o octanoato de metila. Na avaliação da atividade antimicrobiana, o óleo essencial do jenipapo exibiu uma potente atividade contra todos os microrganismos testados.

Castro e colaboradores (2013) estudaram a alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum*). As folhas de alfavaca-cravo foram colhidas e submetidas à secagem por exposição ao sol. Verificou-se a atividade antimicrobiana do óleo diante das cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Pseudomonas aeruginosa*, através do método de difusão de

discos. Onde o óleo essencial utilizado mostrou atividade antimicrobiana significativa frente à maioria das cepas testadas. O teste de susceptibilidade do óleo frente à bactéria *S. aureus* forneceu halos de inibição com diâmetro em torno de 24 mm.

Martínez, Miranda e Santos (2005), avaliaram a ação de óleos essenciais de plantas utilizadas na medicina tradicional mexicana sobre 324 bactérias isoladas de pacientes pediátricos com infecção severa, sendo 35 amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, 28 amostras de *Escherichia coli*, 14 amostras de *Staphylococcus aureus* entre outras. Neste estudo *Thymus vulgaris*, cujos principais componentes eram timol (39,7%), L-cimeno (30%) e limoneno (1,7%), apresentou ampla atividade antibacteriana sobre as cepas estudadas com halo médio de inibição de 20,1mm.

O *Thymus vulgaris* (tomilho) tem sido usado em fitoterápicos, em cosméticos e em indústrias de alimento. Na medicina ocidental, a aplicação principal está no tratamento de queixas digestivas, de problemas respiratórios e na prevenção e no tratamento de infecções. A atividade biológica do óleo essencial do tomilho está relacionada a seus principais constituintes, timol e carvacrol. O Timol tem mostrado efeitos antibacterianos, antifúngicos e antielmínticos e o carvacrol tem efeito bactericida. Além disso, o óleo essencial apresentou significativa atividade antioxidante (ULTEE et al., 1998).

O safrol é um fenilpropanóide, outro componente de óleos essenciais com reconhecida ação antiinflamatória e sinérgica, sendo também comprovada a sua atividade carcinogênica “in vitro”. Apresenta grande importância científica-tecnológica como precursor de uma variedade de compostos bioinseticidas biodegradáveis, fixadores de aroma e, mais recentemente, de drogas antitrombóticas e auxinas endólicas (JARDIM,2011).

3.7 *Dysphania ambrosioides* L.

No Brasil a espécie *Dysphania ambrosioides* L. é conhecida popularmente como mastruz, mastruço ou erva-de-santa-maria. Pertence à família *Amarantaceae*, à sub-família *Chenopodiaceae*. Denominação vinda das palavras gregas “*chen*” e “*pous*”, que significam respectivamente, ganso e pé. É uma espécie oriunda da América tropical, mas que se difundiu pelo mundo (MATOS, 2011).

O Ministério da Saúde elaborou a Relação Nacional de Plantas de Interesse ao SUS (RENISUS) em 2009, que apresenta uma lista de 71 plantas medicinais indicadas para uso terapêutico da população, dentre elas está *D. ambrosioides* (BRASIL, 2009). As folhas e flores dessa planta são utilizadas para tratar resfriados, como hemostático, vermífugo e anti-

helmíntico. É usado na medicina tradicional como agentes analgésicos, antipiréticos, anti-oxidante e para curar a doença gastrointestinal, a febre tifóide e disenteria (BRAHIM et. al., 2015).

Figura 06: *D. ambrosioides* (mastruz)



O óleo essencial de *D. ambrosioides* mostrou natureza fungistática de toxicidade contra as duas estirpes de *Aspergillus flavus*. E inibiu o crescimento micelial de ambas estirpes de fungos testados a 100 ug / ml, sendo mais eficaz do que os fungicidas sintéticos. O óleo da *Dysphania* exibiu amplo espectro antifúngico contra todos os fungos testados, além de inibir absolutamente o crescimento de *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Botryodiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Macrophomina phaseolina*, *Cladosporium cladosporioides*, *Helminthosporium oryzae* e *Pythium debaryanum* em 100 ug/ ml (KUMAR, 2007).

Num estudo sobre a atividade do óleo essencial de *D. ambrosioides* em ratinhos infectados com *Leishmania amazonensis*, os animais infectados receberam dois ciclos de tratamento por diferentes vias (intraperitoneal, oral ou de rota intralesional). A administração intraperitoneal do óleo essencial evitou o desenvolvimento da lesão e diminuiu a carga parasitária. Estes dados demonstram que este produto natural pode ser uma alternativa para o desenvolvimento de um novo medicamento contra a leishmaniose cutânea (MONZOTE, et. al., 2007)

Segundo Borba e Macedo (2006), o mastruz é utilizado também como antibiótico, para inflamação dentária e cicatrização. Sua forma de uso é chá ou infusão através do decoto e maceração, misturando-o à água e leite. Já foi observado que o extrato aquoso do mastruz

favoreceu a cicatrização de feridas cutâneas em ratos (SERVIO et. al., 2011). A planta também ajuda no tratamento de miomas uterinos hemorrágicos (CRUZ et. al., 2006). Esse potencial cicatrizante e anti-hemorrágico merece atenção na busca por produtos que auxiliem o tratamento das doenças periodontais e outros que aliviem o incômodo pós-cirurgia odontológica. Trata-se de uma espécie medicinal com muitos atributos para uma possível aplicação odontológica.

3.8 *Ocimum campechianum* Mill.

A família Lamiaceae apresenta um número expressivo de espécies, cerca de 252 gêneros, nos quais se distribuem 6700 espécies. Além da importância do ponto de vista medicinal, esta família também é fonte de espécies com grande valor como condimentos, alimentos e na indústria de perfumes e cosméticos. Dentre os inúmeros gêneros, destacam-se *Mentha*, *Ocimum* e *Plectranthus* (DISTASI; HIRUMA-LIMA, 2002). As espécies popularmente conhecidas como alfavaca, pertencem ao gênero *Ocimum*.

Figura 07: *O. campechianum* (alfavaca do campo) como planta ornamental



Trabalhos que abordam plantas do gênero *Ocimum* são abundantes na literatura, contudo, no que se refere em nível de conhecimento à respeito das espécies, muitas ainda têm pouco ou nenhum estudo. *O. basilicum* L., por exemplo, desperta grande interesse. Suas folhas são utilizadas como estomáquico, carminativo, antiespasmódico, para gastrite, constipação (OLIVEIRA, MOREIRA, OLIVEIRA., 2013). É também recomendada para gargarejo contra faringite e aftas. O extrato alcoólico é usado para cicatrização misturado á pomadas (UFSC, 2014).

Os principais constituintes do óleo essencial de alfavaca são linalol, metil-chavicol, citrol, geraniol, timol, α -pineno e eugenol (BLANK et. al., 2004). O linalol é um dos constituintes de maior interesse na espécie *Aniba dukei* Kostermans, conhecida popularmente como pau-rosa, pois vem sendo utilizado há bastante tempo como fixador de perfumes europeus (CHAAR et. al., 2004). O estudo de espécies de alfavaca pode oferecer alternativas a exploração de linalol e ajudar a preservar o pau-rosa da Amazônia. O óleo essencial de *O. basilicum* L. com alta concentração de linalol é valorizado no mercado internacional e amplamente usado nas indústrias de condimentos e cosméticos (CARVALHO FILHO et al., 2006).

O eugenol é um composto fenólico volátil, o principal constituinte do óleo extraído do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), por isso é conhecido como óleo de cravo. Ele é muito utilizado na odontologia como componente de seladores, curativos dentários, restaurações provisórias e outros produtos antissépticos de higiene bucal, tendo comprovado efeito bactericida. O eugenol puro possui efeito alelopático, inibindo a germinação de sementes de várias plantas, assim como diminuindo o crescimento de algumas delas quando em contato com o extrato (MAZZAFERA, 2003).

Os resultados obtidos a partir da análise dos principais componentes dos óleos essenciais de sete espécies de manjeriço revelaram a existência de uma variabilidade elevada na composição química dessas plantas. Eucaliptol foi um constituinte importante encontrado em óleos essenciais de *O. campechianum* e *O. kilimandscharicum*, sendo que o óleo essencial de *O. campechianum* apresentou a maior concentração de 1,8-cineol (eucaliptol) dentre as plantas investigadas. O Eucaliptol é usado em aromas, fragrâncias e cosméticos. Neste óleo também foi identificado o limoneno, um dos terpenos mais comuns na natureza, presente na maioria das lamiaceas (CAROVIC-STANKO et. al., 2010).

3.9 PRODUTOS NATURAIS NA ODONTOLOGIA

Os produtos naturais são fontes promissoras de novos medicamentos (ROSA, 1993). Milhares de produtos naturais, conhecidos como metabólitos secundários, são produzidos pelas plantas como forma de defesa aos ataques de microrganismos, insetos e outros animais (DOMINGO e LÓPEZ-BREA, 2003). Representando uma ferramenta vegetal determinante nos mecanismos de reprodução vegetal, pois cada célula vegetal é dotada de informações genéticas para a proliferação celular e a biossíntese de produtos naturais (BUFFA FILHO et al, 2002). Evidências clínicas e científicas apontando o uso de óleos essenciais nos cuidados à saúde oral são descritas na literatura (FILOGÔNIO, 2011).

Algumas afecções bucais vêm sendo tratadas com a fitoterapia. Espécies como cravo da Índia, romã, malva, tanchagem, amoreira, sálvia, camomila, entre outras, são indicadas nos casos de gengivite, abscesso na boca, inflamação e aftas. E as plantas medicinais mais indicadas, de acordo com a bibliografia consultada em um estudo realizado no Centro Universitário Newton Paiva em Minas Gerais, foram *Punica granatum*, *Althaea officinalis*, *Salvia officinalis*, *Calendula officinalis*, *Malva sylvestris* e *Plantago major* (OLIVEIRA et al., 2007).

2000 extratos vegetais aquosos e orgânicos obtidos de plantas da floresta Amazônica e Mata Atlântica e foram testados contra *S. mutans* e *S. sanguinis* através do método da disco-difusão em ágar-sangue. Destes, 17 extratos apresentaram atividade inibitória contra as duas bactérias estudadas. Os extratos de partes aéreas de *Ipomoea sp* (Convolvulaceae) de caule de *Zanthoxylum compactum* (Rutaceae) e caule de *Psychotria sp.* (Rubiaceae) apresentaram atividade mais efetiva contra as bactérias (SILVA, 2009).

Malva (*Malva sylvestris*) é uma das plantas mais citadas em pesquisa. Esta espécie é conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, presença de mucilagens, taninos, óleos essenciais, glicolipídios e flavonóides e vem sendo testada no controle de crescimento de bactérias presentes no biofilme dental (BUFFON et al., 2001) e citada em diferentes levantamentos etnobotânicos (MENDES, MACHADO, FALKENBERG, 2006).

Um estudo na Paraíba objetivou realizar um levantamento etnobotânico sobre a indicação de plantas medicinais para problemas bucais em diferentes regiões do estado. Romã (*Punica granatum L.*) foi a planta mais citada por usuários e dentistas em todas as regiões; 46,5% dos usuário fazem uso de plantas medicinais por automedicação. Apenas 20% dos dentistas recomendam aos pacientes o uso de plantas medicinais e 76% destes desconhecem a possibilidade de reação adversa ou interação medicamentosa quando da utilização de plantas

(OLIVEIRA, 2010).

O interesse por medicamentos alternativos, principalmente daqueles provenientes de extratos naturais, tem aumentado nas últimas décadas. A *Melaleuca alternifolia* é um arbusto, popularmente conhecido como "árvore de chá", cujo principal produto é o óleo essencial (TTO - tea tree oil), de grande importância medicinal por possuir comprovada ação bactericida e antifúngica contra diversos patógenos humanos. Em virtude da atividade terapêutica em diversas especialidades médicas, o TTO passou a ser empregado na área odontológica (OLIVEIRA et.al., 2011).

O óleo de copaíba e suas propriedades medicinais era muito conhecido pelos índios latino-americanos que os utilizavam para curar feridas de guerreiros após batalhas e para passar no coto umbilical de recém-nascidos. Estudos recentes têm demonstrado também grande potencial de uso do óleo de copaíba na odontologia, na composição de cimentos endodônticos e na prevenção e combate da doença periodontal. Há uma grande variabilidade de aplicações do óleo de copaíba (DRUMOND, 2004; PIERI, MUSSI, MOREIRA, 2009).

Os estudos fitoquímicos da jabuticaba encontrados na literatura são poucos, estando reportada a presença de ácido ascórbico, taninos e glicosídeos cianidínicos e peonidínicos (REYNERTSON et al., 2006). Macedo-Costa (2008) observou resultados positivos do extrato do caule de *Myrciaria cauliflora* Berg sobre cepas de *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*, *S. mutans*, *S. sanguinis* e *L. casei*.

Concluiu-se, em um estudo, que o óleo essencial da folha da *Eugeni uniflora* L. (Pitanga) é eficaz na descontaminação de *S. mutans* presentes nas escovas dentárias. O óleo essencial de suas folhas contém citronelol, geraniol, cineol e sesquiterpenos (OLIVEIRA et.al., 2009).

A atividade antibacteriana positiva do óleo essencial de *T. vulgaris* (Tomilho) frente a *S. mutans*, que é um agente importante de doenças da cavidade oral, incentiva estudos futuros, tanto farmacotécnicos, como a avaliação da atividade biológica visando o desenvolvimento de produtos com aplicação profilática ou terapêutica (SANTOS et. al., 2014).

Segundo Magalhães (2010), o extrato da espécie *Piper aduncun* (pimenta do macaco) é mais ativo sobre o *S. mutans* do que sobre *S. sanguis*, apresentando capacidade de inibir a aderência e reduzir a acidogênese do *S. mutans* in vitro, não sendo citotóxico para células de mamíferos, o que sugere que ele pode ser uma fonte promissora de novos compostos antimicrobianos direcionados para prevenção da cárie dental. A aplicação tópica de substâncias bactericidas para controlar o crescimento da placa dental é uma estratégia amplamente utilizada.

Os extratos de *Cymbopogon citratus*, *Piper aduncun* e *Porophyllum ruderale*, podem ser úteis no tratamento das doenças periodontais (MOURA, 2006; OLIVEIRA, 2010). A sensibilidade de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mitis*, *S. oralis* e *S. mutans* foram avaliadas frente aos extratos de romã, alho, espinheira santa, folha da goiabeira e óleo de copaíba, e verificou-se que todos apresentaram resultados positivos frente às cepas testadas (MENEZES, SOUZA, BOTELHO, 2004).

Uma triagem com 1220 extratos orgânicos e aquosos obtidos da Floresta Amazônica e Mata Atlântica, contra *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *P. aeruginosa* e *E.coli*, foi realizada por Suffredini et al. (2006). Nenhum extrato apresentou atividade contra as bactérias Gram-negativas, ao passo que 17 extratos obtidos de 16 plantas foram ativos contra as Gram-positivas, em doses $\leq 20\text{mg/mL}$. Os extratos foram obtidos das famílias *Annonaceae*, *Combretaceae*, *Gnetaceae*, *Lauraceae*, *Leguminosae*, *Myristicaceae*, *Myrsinaceae*, *Myrtaceae*, *Piperaceae*, *Proteaceae*, *Rubiaceae*, *Rutaceae*, *Smilacaceae* e *Vochysiaceae*.

Um estudo avaliou a atividade antimicrobiana de seis produtos comercialmente disponíveis frente a *S. mutans*, *E. faecalis*, *S. aureus* e *C. albicans*. Verificou-se a sobrevivência dos microrganismos após 30, 60 e 90 segundos de contato com os produtos. Os resultados indicaram diferenças na sobrevivência dos microrganismos e o produto composto por óleos essenciais evidenciou a melhor atividade antimicrobiana (BUGNO, et.al.; 2006).

A eficácia de ervas medicinais, tanto nos cremes dentais como nos enxaguatórios bucais, para o tratamento da placa dentária, dos sangramentos gengivais e do pH da saliva total foi investigada em um estudo simples-cego com 50 estudantes. O pH da saliva foi bastante elevado para o âmbito alcalino pela aplicação dos produtos vegetais (WILLERSHAUSEN, GRUBER, HAMM, 1994).

Zanin e colaboradores (2007) realizaram o levantamento de quatorze enxaguatórios de venda livre ao consumidor mostraram que as substâncias ativas fluoreto de sódio, cloreto de cetilpiridínio, triclosan, digluconato de clorexidina, timol, mentol, eucaliptol e extratos vegetais foram as mais associadas nas formulações. Baseado neste levantamento, foi desenvolvido um enxaguatório bucal com os ativos triclosan, fluoreto de sódio e extrato hidroalcoólico de sálvia, conforme características desejadas para esses produtos, como ausência de turbidez e palatabilidade agradável. O uso de sálvia deveu-se às suas propriedades antimicrobianas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

A alfavaca (*O. campechianum* Mill.) e o mastruz (*D. ambrosioides* L.) foram coletados no município de Santa Izabel do Pará no mês de junho, às 14 horas da tarde, junto aos fornecedores de estabelecimentos comerciais de feiras da região. Parte do material vegetal foi depositado para preparação da exsicata e depósito no herbário da Embrapa (Empresa Brasileira de Pecuária e Agricultura). As amostras para a extração dos óleos essenciais foram levadas aos Laboratórios de Investigação Sistemática da Universidade Federal do Pará (LabISisBio) e submetidas à assepsia com água corrente, de modo que os contaminantes como insetos, areia, e terra fossem retirados. As folhas foram separadas dos talos e armazenadas sobre a bancada forrada com papel até secagem da água. Após 48h, as folhas foram selecionadas e suas massas medidas. Em seguida 400g foram submetidos a extração.

4.2 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

O método utilizado para a extração dos óleos essenciais de *D. ambrosioides* ou mastruz (OEM) e de *O. campechianum* ou alfavaca (OEA) foi a hidrodestilação segundo Santos e colaboradores, 2004. Este método consistiu na utilização de 400g de amostra em 3L de água destilada introduzidas em um balão de fundo redondo de 6L acoplado a uma manta aquecedora e conectado a um extrator Clevenger preenchido equilibradamente com água destilada conforme mostra a Figura 08. Este sistema tem a temperatura equilibrada com o auxílio da unidade refrigeradora, por isso é conhecido como extrator Clevenger modificado. Precisa-se acionar o refrigerador antecipadamente ao processo de evaporação, cerca de 60 minutos antes. Após 2 horas de iniciado o sistema, se observou o começo da evaporação e a obtenção de óleo em uma média de mais 2 horas, finalizando um total de 4 horas de ciclo. A quantidade de óleo extraída foi aferida no extrator Clevenger o qual é graduado e indica o volume obtido de óleo ao final do processo. Após resfriamento do sistema o óleo essencial foi coletado em um frasco de vidro âmbar. Utilizou-se sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para separar óleo e água remanescente. A amostra de óleo essencial foi armazenada em refrigerador.

Figura 08: Sistema Clevenger modificado



Ao final da extração de cada óleo foi calculado o rendimento da obtenção de acordo com a equação 1 abaixo:

$$R(\%) = \frac{N_a}{N_t} \times 100\% \quad \text{Equação 1}$$

Onde: R% é o rendimento; N_a é a quantidade de óleo essencial obtido; N_t é a massa total de amostra utilizada

4.3. CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD)

Os óleos essenciais de alfavaca e mastruz obtidos foram analisados inicialmente em cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando como suporte placas cromatográficas (MN – C CMALUGRAM Xtra SIL G/UV254). Para o sistema de eluição foi utilizada a mistura de acetato de etila e hexano na proporção de 75 : 25. Após a corrida cromatográfica as partições foram reveladas com uma solução de etanol e ácido sulfúrico na proporção de 80:20 adicionado de 2% de vanilina (p/v), o aparecimento das bandas só foi visível após 5 minutos de secagem com aquecimento constante.

4.4 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA

Foi inserido em um vial 10µl da amostra de óleo essencial e solubilizado com 1ml de hexano. Essa solução foi injetada num cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de

massa (GC/MS) para a identificação dos componentes presentes na amostra.

Utilizou-se o cromatógrafo TRACE 1300 Séries GC da marca Thermo, equipado com injetor “split/splitless”, acoplado a um espectrômetro de massa (ISQ QD GC/MS). A coluna para a injeção foi a coluna Rxi 5 Sil MS (30m x 0.25mm ID, 0,25µm) do fabricante RESTEK. A temperatura do injetor foi 220°C e a temperatura do MS linha de transferência foi de 240°C. A temperatura programada no forno GC foi de 60°C a 246°C com velocidade de 3°C/min. O gás carreador foi hélio com um fluxo de 1,0 ml/min. A injeção da amostra foi no modo splitless. O volume de injeção da amostra foi de 1µl. Os espectros de massa foram comparados com os listados por Adams (2007).

4.5 CEPAS BACTERIANAS:

As linhagens de bactérias utilizadas nesse estudo foram cedidas pela coleção do Laboratório de Microrganismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ). As cepas e seus códigos de origem são: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 29522), *Lactobacillus casei* (ATCC 7469), *Lactobacillus fermentum* (ATCC 9338), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus oralis* (ATCC 10557). Cada cepa liofilizada foi reativada de acordo com as indicações da FIOCRUZ e foram cultivadas em meio específico (Tabela 02) para cada tipo bacteriano, também recomendado pelo laboratório de origem.

Tabela 02: Meios de cultura utilizados no cultivo de cada bactéria

Bactéria	Meio de cultura	Referência
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Brain Heart Infusion (BHI) Ágar	Zambon, Slots e Genco, 1983
<i>Lactobacillus casei</i>	Caldo Lactobacillus MRS	De Man, Rogosa e Sharpe, 1960
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Caldo Lactobacillus MRS	De Man, Rogosa e Sharpe, 1960
<i>Streptococcus mutans</i>	Trypticase soy agar	Clark, 1924
<i>Streptococcus sanguinis</i>	Trypticase soy agar	Clark, 1924

4.6 PREPARO DA SUSPENSÃO BACTERIANA PARA OS ENSAIOS

Foram transferidos 9 mL do meio líquido estéril para tubos de ensaio de 25mL. A partir de uma cultura fresca, retirou-se uma alíquota da suspensão de bactérias e transferiu-se para o tubo contendo a solução salina. A suspensão bacteriana foi homogeneizada em vórtex e a turbidez ajustada a 0,5 McFarland (equivalente a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia para cada mL -UFC/mL). Para o preparo da solução padrão de BaSO₄ (sulfato de bário), denominada de solução 0,5 de McFarland, acrescentou-se uma alíquota de 0,5mL de BaCl₂ 0.048 mol/L (1,175% v/v BaCl₂ • 2H₂O) a 99,5mL de H₂SO₄ 0,18mol/L (1% v/v), homogeneizando constantemente para manter a suspensão. A densidade correta do controle de turbidez foi verificada usando um espectrofotômetro com fonte de luz de 1cm e cubeta apropriada para determinar a absorvância. A absorvância da solução padrão 0,5 de McFarland varia de 0,08 a 0,10 utilizando um comprimento de onda de 625 nm (ANVISA, 2014).

4.7 MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO EM ÁGAR

Foi utilizado o método de disco difusão em Ágar, no qual uma alíquota da suspensão bacteriana preparada a 0,5 McFarland foi semeada uniformemente sobre toda a superfície do meio de cultura contido na placa de petri. e discos estéreis de papel-filtro de 6mm de diâmetro foram levemente dispostos sobre o meio semi-sólido em pontos equidistantes dessa placa. Para cada bactéria foi utilizado meio de cultivo bacteriano de acordo com especificações da FIOCRUZ. Diferentes discos foram impregnados com alíquotas de 10 µL de variadas concentrações do óleo essencial (1%, 5%, 10%, 25%, 50% e 75%) com adição do agente emulsificador Tween 80 (0,5%), visando melhorar a difusão do óleo essencial no Ágar. Como controle positivo foi utilizado 10 µL de solução de clorexidina (0,12%) e como controle negativo 10 µl do agente emulsificador Tween 80 (0,5%). As placas de culturas com os discos foram incubadas à temperatura de 36°C por até 72h, com visualização a cada 24 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados, obtidos através da mensuração do diâmetro dos halos de inibição formados ao redor dos discos com o auxílio de régua e calculados pela média aritmética e desvio-padrão dos diâmetros, expressos em centímetros para obter-se os parâmetros de inibição entre as substâncias utilizadas nos discos de papel (BAUER et al., 1966; NCCLS, 2003).

4.8 INIBIÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS OEM E OEA

Os ensaios de inibição do crescimento foram realizados conforme a metodologia descrita por BROEKAERT, CAMMUER e WANDERLENDEN (1990), com algumas adaptações. Placas de microtitulação de poliestireno de fundo chato de 96 poços (placas de microdiluição) foram utilizadas. Em cada poço foi adicionado 10 µl da suspensão bacteriana anteriormente preparada para os ensaios, 180 µl do meio indicado para determinada bactéria a ser avaliada e 10 µl do óleo essencial diluído em solução tween 80 a 0,5% (v/v). Após 24 h e 48 h de incubação a 36 °C, 100 µl das amostras foram plaqueadas nos respectivos meios de cultura e as placas foram incubadas nas mesmas condições para contagem no número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Os controles negativos e positivos para inibição do crescimento constituíram poços contendo apenas os meios indicados para cada bactéria e poços contendo além do meio, a solução de clorexidina a 0,12%, respectivamente. As concentrações dos óleos capazes de reduzir em 50 % o crescimento bacteriano do controle, após 24 h e 48 h de ensaio foram identificadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS OEA E OEM E IDENTIFICAÇÃO CROMATOGRÁFICA

Neste trabalho se observou que o óleo essencial de *O. campechianum* obteve melhor rendimento quando comparado ao óleo de *D. ambrosioides*, apresentando rendimentos de 0,45% e 0,39%, respectivamente. Muhayimana et. al. (1998) obteve rendimento de 0,3% para o óleo essencial de folhas de *D. ambrosioides* e Gupta et. al. (2002) apenas 0,25% em massa seca. Enquanto que Onocha et al (1999) obteve um baixo rendimento obtendo a quantidade de apenas 0,06% de óleo essencial de folhas secas de *D. ambrosioides*. Já em estudos com óleo essencial de folhas de *O. campechianum*, Figueiredo (2014) alcançou 0,47% de rendimento em massa úmida, semelhante ao obtido neste estudo, porém o mesmo autor conseguiu maior rendimento quando realizado extração em folhas secas, obtendo 0,56% de rendimento. Já Vieira & Simon (2000) e Vieira et al. (2001) obtiveram, para o mesmo óleo, rendimentos variando de 0,3% a 3,6%.

O conteúdo e quantidade de óleo essencial podem variar consideravelmente de espécie para espécie, em função de parâmetros climáticos e de fatores agrônômicos como fertilização, irrigação, colheita e, especialmente a fase de desenvolvimento da planta na época da colheita. As plantas se desenvolvem de diversas formas dependendo do meio ambiente em que se encontra, isto é, diferindo na sua aparência e diversidade qualitativa e quantitativa, geralmente detectada na composição do óleo essencial obtido (KERROLA et al., 1994). Carvalho Filho et al. (2006) verificaram maior rendimento do óleo essencial de manjeriço quando a massa fresca de folhas e inflorescências são utilizadas. Chaves (2002) observou que com relação às doses de adubo, as épocas de corte de outono e de inverno não apresentaram diferença estatística na produção de folhas de alfavaca cravo (*O. gratissimum*) devido ao tempo de uma espécie subarborescente relativamente grande produzir biomassa de folha e absorver os nutrientes disponibilizados no solo pelos adubos, mesmo havendo uma tendência a essa diferença de produção de folhas, de forma crescente, porém pequena.

Análise preliminar em cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada e a revelação feita com vanilina sulfúrica (Figura 09). Essa avaliação cromatográfica mostrou-se relevante quando, posteriormente, teve seus resultados comparados aos obtidos na cromatografia gasosa.

O OEA obtido apresentou claramente uma substância majoritária em grande concentração, enquanto que OEM apresentou mais de uma substância com concentração aparentemente mais elevada, assim como maior número de substâncias quando comparado com o OEA. Análises preliminar em CCD são importantes para conhecimento e determinação dos parâmetros que serão tomados para identificação das substâncias e pureza do material.

Figura 09: Placa de CCD dos óleos essenciais



*A – óleo de alfava e M – óleo de mastruz

5.1.1. Identificação da composição do óleo essencial de *D. ambrosioides*

As substâncias majoritárias encontradas para as amostras do óleo essencial de mastruz foram delta-2-careno (60,01%), orto-cimeno (26,16%), cis-piperitone (7,55%), trans-ascaridol (1,26%) e ácido oleico (1,04%). Na literatura, o ascaridol é muitas vezes encontrado como a substância de maior percentual na constituição do óleo essencial de mastruz de diferentes regiões (RONDELLI et. al., 2012; JOHNSON CROTEAU, 1984). Cavalli (2004) e colaboradores definiram o óleo de mastruz como uma mistura de ascaridol (55,3 8%), p-cimeno (16,2%), alfa-terpineno (9,7%), isoascaridol (4,3%) e limoneno (3,8%). As análises em GC/MS realizadas neste trabalho apresentaram diferenças de concentrações e substâncias majoritárias para o óleo de *D. ambrosioides* quando comparado com Cavalli (2004).

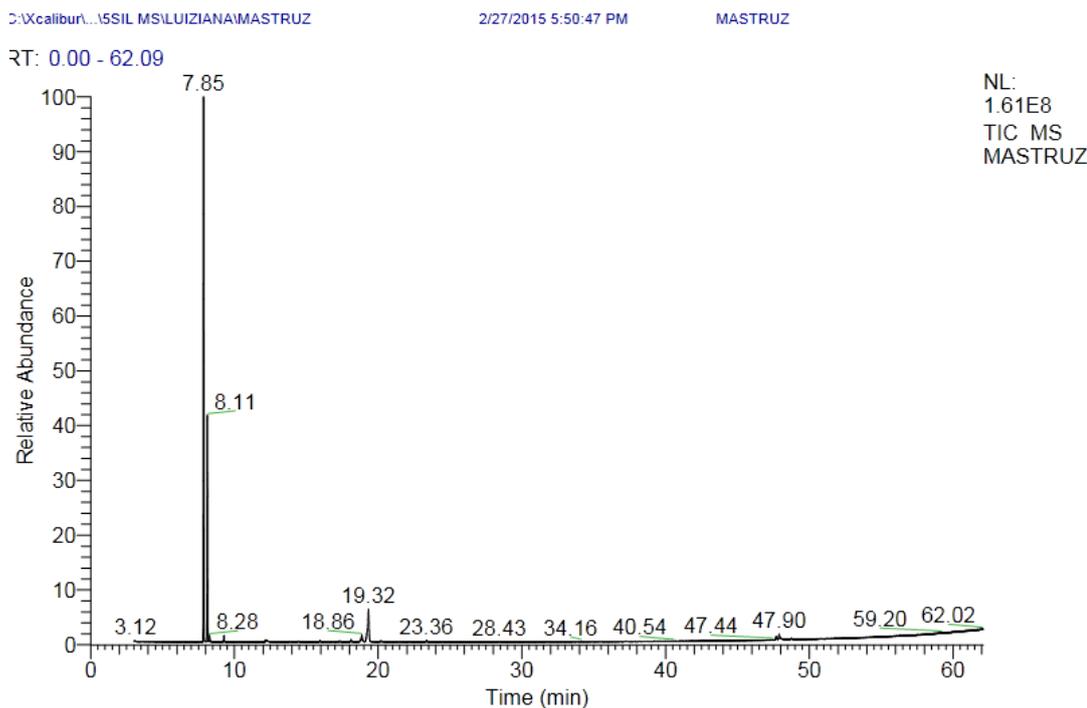
As substâncias identificadas no OEM estão dispostas na Tabela 03 e a representação do cromatograma obtido em GC/MS na Figura 10:

Tabela 03: Composição do óleo essencial de *D. ambrosioides*

TR	Substâncias	IK	ICI	%Área
7.85	δ-2-Careno	1001	924	60,01
8.11	orto-Cimeno	1022	934	26,16
8.28	limoneno	1024	857	0,82
9.27	γ -Terpinene	1054	868	0,90
12.17	3-methyl-1,2-Ciclohexanedione	1085	688	0,52
17.31	cis-piperitona epoxide	1050	776	0,22
18.1	trans-ascaridol glicol	1266	828	0,51
18.86	trans- ascaridol glicol	1266	854	1,26
19.32	cis-epóxido de piperitona	1050	734	7,55
23.36	metil-eugenol	1403	760	0,33
47.68	linoleato de metila	2095	847	0,68
47.9	ácido oléico	2141	862	1,04

*TR – Tempo de retenção encontrado para cada substância; IK-Índice Kovats; ICI-Índice de confiabilidade de Identificação;

Fonte: LabISisBio

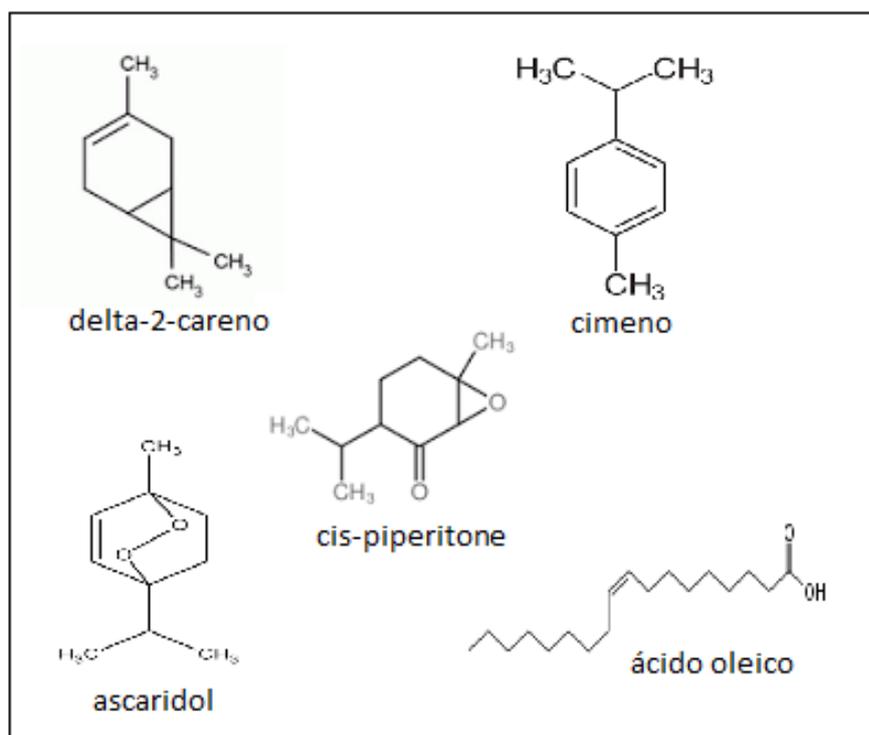
Figura 10: Perfil cromatográfico do óleo essencial de *D. ambrosioides*

Fonte: LabISisbio

Nascimento et al., 2009, em seu estudo obteve o cromatograma do óleo essencial de *D. ambrosioides* e mostrou que 13 substâncias foram detectadas, correspondendo a 88,05% da sua constituição sendo estes o (Z)-ascaridol (60,63%), (E)-ascaridol (17,97%) e carvacrol (3,15%), semelhante aos resultados encontrados na literatura. No trabalho de Rondelli e colaboradores (2012), os constituintes do óleo essencial de erva-de-santa-maria (*D. ambrosioides*) foram identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa e os componentes do óleo e seus respectivos teores expressos em normalização de área (%) foram: α -terpineno (1,24%), *p*-cimeno (4,83%), (Z)-ascaridol (87,0%), piperitone (0,7%), (E)-ascaridol (5,04%). Brahim, et.al., 2015 obteve como principais constituintes para o óleo essencial de mastruz terpineno (23,77%), ascaridol (14,48%), *p*-cimeno (12,22%), neral (8,08%), o geraniol (5,60%), isoascaridole (2,96%) e 2-careno (2,77%).

Neste contexto, pode-se observar que a constituição química do óleo essencial dessa espécie de *Dysphania* varia de acordo com período e local de coleta, sugerindo que sua composição depende de fatores ambientais, sazonais ou regionais, como já mencionado na literatura (CERQUEIRA et. al., 2007). No presente estudo as substâncias de maior concentração foram delta-2-careno, orto-cimeno, cis-piperitona, trans-ascaridol e ácido oléico (FIGURA 11).

Figura 11: Estruturas de substâncias majoritárias de *D. ambrosioides*



O cimeno, segundo maior constituinte encontrado neste estudo com 26,16% da composição total é definido quimicamente como 1-isopropil-4-metilbenzeno é um monoterpene aromático biossintético de fórmula molecular C₁₀H₁₄, precursor do carvacrol e largamente presente entre os óleos essenciais, sendo o constituinte majoritário em várias espécies vegetais apresentando 83,75% em *Origanum saccatum*, 53,07% em *Origanum solymicum* e 44,13% em *T. vulgaris* (POULOSE & CROTEAU, 1978; ADAMS, 2009). Além disso, o p-cimeno vem sendo alvo de estudos em outros trabalhos os quais demonstram atividade antinociceptiva (SANTANA et al., 2011), antibacteriana (BAGAMBOULA et al., 2004), antifúngica, herbicida (KORDALI et al., 2008), antileishmania (DE MEDEIROS et al., 2011) e anticolinesterásico (ÖZTÜRK, 2012).

O terceiro constituinte em maior concentração foi a piperitona (7,55%). Ozturk et al., 2006, encontraram atividade antibacteriana frente à *Bacillus dipsauri*, *Corynebacterium cystitidis* e *Corynebacterium flavescens* usando piperitona em composição com outros componentes de óleos essenciais. Estudos *in vitro* realizados por WEI et al. (2013) evidenciaram que o *D. ambrosioides* possui ação bactericida contra o *Helicobacter pylori* resistente a vários antibióticos.

O ascaridol (1,4-epidioxi-p-mentano) diferentemente do que se tem observado na literatura, se apresentou em menor quantidade (1,26%), porém ainda majoritário, em geral

está presente em toda a planta sendo extraído em maior concentração do óleo essencial obtido das sementes do *D. ambrosioides* (GADANO et al., 2006). Este princípio ativo é um endoperóxido pouco solúvel em água possuindo maior afinidade por solventes apolares como o hexano, sendo este solvente bastante utilizado na obtenção de extratos aquosos (MACDONALD et al., 2004). O ascaridol possui propriedade antiparasitária, antimalárica, antifúngica, hipotensora, relaxante muscular, estimulante respiratório, depressora cardíaca, antibacteriana, anti-tumoral e analgésica.

5.1.2 Identificação da composição do óleo essencial de *O. campechianum*

Os principais componentes encontrados na composição de óleos essenciais do gênero *Ocimum* foram linalol, metil chavicol, cinamato de metila, metil-eugenol. Outros quimiotipos foram recentemente encontrados como o β -cariofileno em *O. tenuiflorum* L. (SIMON et al., 1999) e *O. campechianum* (VIEIRA e SIMON, 2000), citral em *O. citriodorum* (MORALES et al., 1993) e cinamato de etila em *O. gratissimum* (DUBEY et al., 2000); 1,8-cineol em *O. campechianum* (VIEIRA E SIMON, 2000). Neste trabalho o óleo essencial de *O. campechianum* apresentou como substâncias majoritárias o metil-eugenol (81,03%), cariofileno (4,17%), 1,8-cineol (3,33%), isoeugenol (2,70%) e biciclogermacreno (2,11%) (Tabela 04). Dessa maneira, esse composto apresentou na sua constituição monoterpenóides e sesquiterpenoides, assim como descrito na literatura. As substâncias encontradas no OEA estão dispostas na Tabela 04 e a representação do cromatograma obtido em GC/MS na Figura 12:

Tabela 04: Composição do óleo essencial de *O. campechianum*

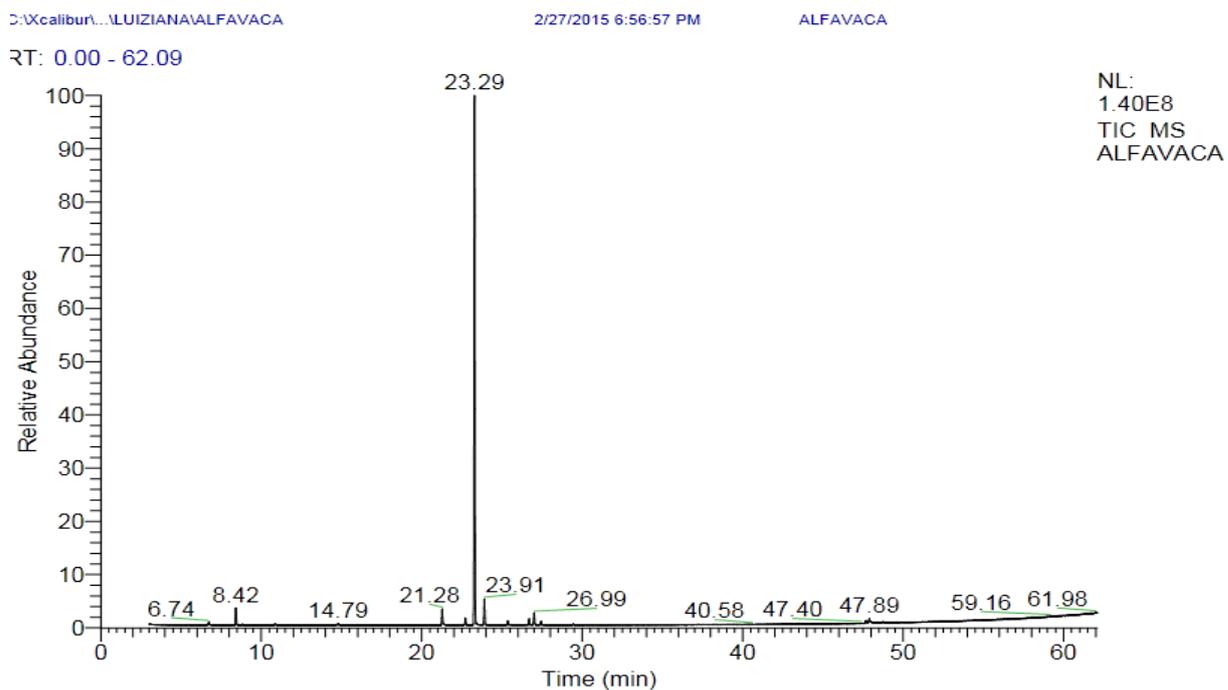
TR	SUBSTÂNCIAS	IK	ICI	% ÁREA
6.74	octeno-3-ol	0974	849	0.50
8.42	1,8-Cineol	1026	875	3.33
8.82	β -ocimene	1032	821	0.22
10.87	Linalol	1088	793	0.33
14.79	metil chavicol	1195	866	0.41
21.28	Z-Isoeugenol	1406	916	2.70
22.72	β -elemeno	1389	900	1.15
23.29	metil-eugenol	1403	943	81.03

23.91	Cariofileno	1417	948	4.17
25.37	α -Humeleno	1452	866	0.79
26.69	espirolepequino	1449	914	1.07
26.99	Biclogermacreno	1500	924	2.11
27.44	germacreno	1508	862	0.69
47.68	linoleato de metila	2095	859	0.64
47.89	ácido oleico	2141	852	0.88

*TR – Tempo de retenção encontrado para cada substância; IK-Índice Kovats; ICI-Índice de confiabilidade de Identificação;

Fonte: LabISisBio

Figura 12: Perfil cromatográfico do óleo essencial de *O. campechianum*



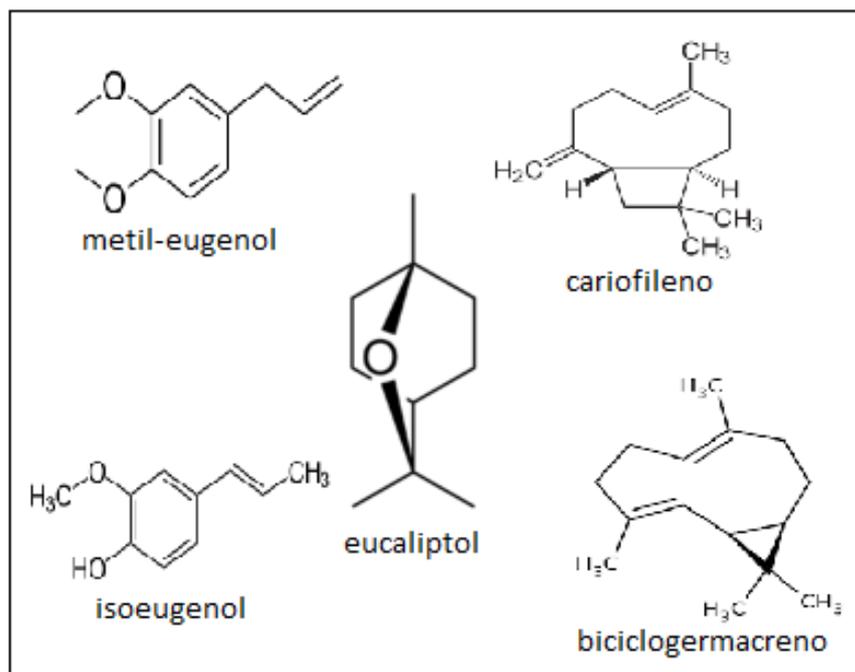
Fonte: LabISisBio

Vieira & Simon (2000) e Vieira et al. (2001) caracterizaram quimicamente espécies de *Ocimum* encontradas nos mercados e usadas na medicina popular brasileira. Todos os óleos foram extraídos por hidrodestilação. Quimicamente *O. gratissimum* mostrou alto percentual de eugenol (40-66 %) e timol (31 %), *O. campechianum* revelou alto teor de 1,8-cineol (62 %) e b-cariofileno (78,7 %), para *O. basilicum* foram encontrados os seguintes constituintes: 1,8-cineol (22 %), linalol (49,7 %), metil chavicol (47 %) ou cinamato de metila (65,5 %). *O. americanum* apresentou alto teor de cinamato de metila (> 90 %) e *O. selloi* revelou como principal constituinte metil chavicol (\pm 40 %). Essa diversidade em termos quantitativos e qualitativos revela toda a complexidade de constituição dos óleos essenciais, que por definição são misturas complexas, podendo conter 100 ou mais compostos orgânicos (WATERMAN, 1993).

O eugenol, principal constituinte encontrado em algumas espécies do gênero *Ocimum*, apresentou atividade inibitória forte e moderada em um estudo com amostras de *Alicyclobacillus* spp. (OLIVEIRA E ABREL FILHO, 2012) e obteve resultados mais eficientes ainda frente a bactérias formadoras de esporos, *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* (TIPPAYATUM e CHONHENCHOB, 2007). Hume (1998) demonstrou que o eugenol confere propriedades farmacológicas aos cimentos obturadores de canal dentário, pois é capaz de eliminar bactérias. CRUZ et. al, 2001, testou diferentes tipos de cimentos odontológicos à base de eugenol contra *S. aureus*; *S. mutans*; *S. salivarius* e *C. albicans* e constatou ação inibitória em diferentes níveis, confirmando o efeito bactericida do eugenol. Parte da atividade biológica do eugenol se dá provavelmente pela capacidade de coagular proteínas (OGATA et al., 1984). Abdulkader; Duguid; Sauders; (1996) testaram a sensibilidade de algumas bactérias anaeróbicas aos cimentos obturadores de canais dentários e todos os materiais testados foram efetivos para as bactérias estudadas.

Neste trabalho o metil-eugenol foi a substância que apresentou maior concentração no óleo essencial de *O. campechianum* (81,03%), seguido das substâncias cariofileno, 1,8-cineol, isoeugenol e biciclogermacreno (FIGURA13). O metil-eugenol é bastante utilizado atualmente na composição de inseticidas (ANVISA, 2006). Um estudo relatou a atividade acaricida do óleo essencial de *Croton malambo* sobre o ácaro doméstico *Dermatophagoides farinae*, devido a presença de metil-eugenol na composição desse óleo (MEZA et. al., 2014). Já o isoeugenol, constituindo 2,70% na composição do óleo há tempos vem sendo usado como aromatizante de bebidas, alimentos e fármacos (AFFONSO et. al 2012).

Figura 13: Estruturas de substâncias majoritárias de *O. campechianum*



O cariofileno, segundo maior constituinte encontrado (4,17%) é descrito na literatura como antiinflamatório, bactericida e agente antitumoral. São muitos os trabalhos sobre óleos essenciais ricos em sesquiterpenos apresentando, inclusive, (*E*)-cariofileno como principal componente, com atividade antimicrobiana e antifúngica. E óleos ricos na mistura (*E*)-cariofileno/biciclogermacreno ou (*E*)-cariofileno/germacreno D, também têm demonstrado potente atividade antimicrobiana (MAIA et al., 2010).

Um monoterpeneo muito importante está presente neste óleo essencial, 1,8-cineol, mais conhecido como eucaliptol encontrado em diversos óleos essenciais, neste, sua abundância teve um percentual de 3,33%. Esse componente pode ser utilizado em variados ramos da indústria, devido seu odor característico e canforáceo. Auxilia no tratamento de doenças respiratórias e dores em geral. Pesquisas são realizadas a respeito da ação alelopática nos vegetais que o contém (ROSADO et al. 2011 e BRITO et al. 2012).

Um sesquiterpeno de grande importância por sua atividade antimicrobiana encontrado na amostra foi o biciclogermacreno (2,11%). O composto biciclogermacreno, um sesquiterpenóide, e outros terpenóides com atividade antifúngica têm sido identificados em extratos de outras espécies. O óleo essencial de *Piper cernuum* e *P. regnellii* cuja composição contém entre outros compostos, biciclogermacreno, mostrou atividade antimicrobiana (CONSTANTIN et al., 2001; CYSNE et al., 2005). O óleo essencial de *Calea clematidea*,

contendo o composto germacreno B também apresentou atividade fungitóxica (FACH et. al., 2002).

A composição e quantidade de cada uma destas substâncias existentes no óleo essencial varia de acordo com os fatores ambientais, esta característica, que compreende diferentes quantidades de agentes antimicrobianos na composição do óleo em diferentes períodos do ano, pode ser o fator principal para a seleção de um óleo com potencial ação antibacteriana (CERQUEIRA et. al., 2007). Isso estimula novos estudos que abordem critérios de sazonalidade sobre as espécies investigadas.

5.2. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Vários agentes antimicrobianos vêm sendo estudados, com o objetivo de inibir ou reduzir a formação do biofilme dental, crescimento bacteriano, e conseqüentemente a adesão de microrganismos à superfície dentária (MORAN ET AL., 2001). Nas últimas décadas, os fitofármacos têm assumido um papel importante como meio terapêutico alternativo na odontologia, mediante as suas propriedades antimicrobianas frente às afecções bucais, principalmente as decorrentes do biofilme dental (GEBARA; ZARDETTO; MAYER, 1996; PEREIRA, 1998). AKPATA E AKINRIMISI (1997) afirmam que o extrato aquoso de plantas inibe o crescimento de *S. mutans* no biofilme dental, patógeno altamente responsável pela formação de cárie.

Neste trabalho a avaliação preliminar da atividade antimicrobiana dos óleos OEA e OEM em disco difusão mostraram certo potencial diante das bactérias estudadas nas concentrações de 1%, 5%, 10% e 25%, porém para as concentrações de 50% e 75% observou-se halos de iguais tamanhos ou menores quando comparado aos halos de menor concentrações, isso possivelmente se deve ao fato de que a quantidade de óleo utilizada é igual ou superior à solução de tween 80 (0,5% v/v) utilizada para solubilizar a amostra. Sendo assim, nestas concentrações não ocorreu total homogeneização do óleo, o que pode ter interferido nos resultados obtidos.

A Figura 14 representa os halos de inibição formados em 4 das bactérias estudadas para OEA. Pode-se observar inibição em concentrações de 1% de óleo essencial, nesta concentração houve inibição do crescimento para as 5 bactérias avaliadas, apresentando halos que variaram de 0,5 a 1,5cm. Algumas destas com atividade superior ao controle positivo (clorexidina 0,12%) como para *S. mutans* e *A. actinomycetemcomitans*, as quais na concentração de 1% apresentaram halos de 1,25cm e 1,5cm, respectivamente, enquanto que o

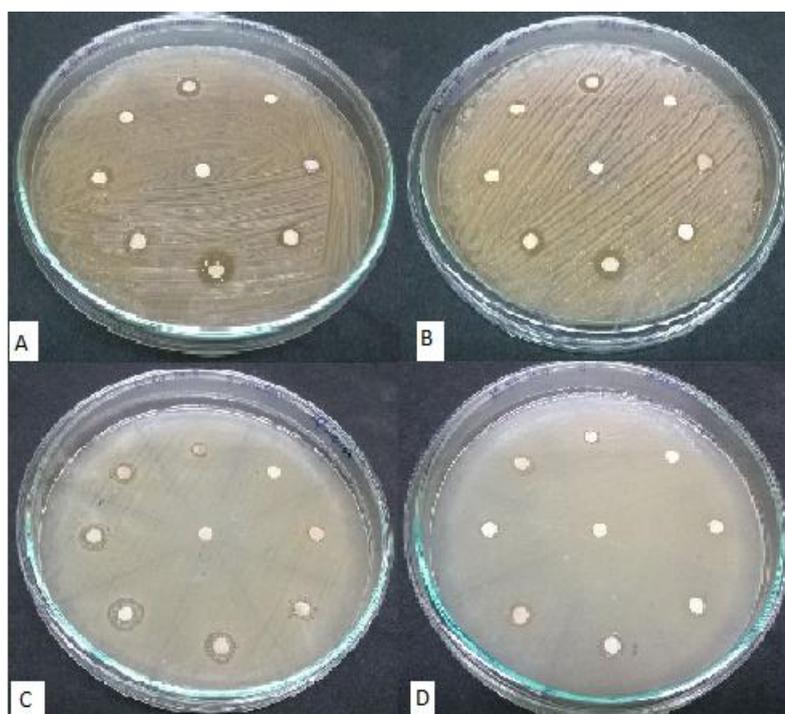
controle positivo apresentou halos de 0,9cm e 0,4cm, respectivamente. Já para as bactérias *L. casei*, *L. fermentum* e *S. sanguinis* observou-se inibição igual ou maior que a clorexidina nas concentrações de 5%, 25% e 25%, respectivamente (Tabela 06).

Na avaliação biológica da amostra de OEM, verificou-se que a mesma não foi capaz de inibir o crescimento de *L. fermentum* nas concentrações de 1% e 5%. Apenas a partir da concentração de 10% pôde-se observar a formação de halo de inibição (Tabela 05). Para as demais bactérias observou-se inibição a partir da menor concentração (1%), porém somente para *A. actinomycetemcomitans* nesta concentração obteve-se resultado superior ao controle positivo, apresentando 1,5cm de halo de inibição, enquanto que a clorexidina apresentou halo de 0,4cm de inibição. A partir da concentração de 10% os halos formados foram de 2,75cm.

Pereira, 1998, estudando extratos hidroalcoólico de *Punica granatum*, encontrou atividades inibitórias para *S. mutans*, *S. sanguinis* e *L. casei* apresentando halos de inibição de 0,2cm, 0,21 e 0,22cm, respectivamente. Ao comparar com os resultados obtidos pelo autor ao utilizar a clorexidina, observa-se igual ou maior inibição frente às bactérias.

Durante as medições observou-se que o óleo essencial de *O. campechianum* além do halo de inibição, apresentou halos com atividade bacteriostática para os *Lactobalillus* enquanto que o óleo de *D. ambrosioides* apresentou a mesma atividade para *A. actinomycetemcomitans*.

Figura 14: Avaliação da atividade antimicrobiana



*Atividade em disco-difusão para OEA: A – *L. casei*; B – *L. fermentum*; C – *S. mutans* e D – *S. sanguinis*

Ramos, 2012, em seu estudo com diferentes enxaguantes bucais, encontrou atividade frente à *L. casei*, obtendo halos que variaram de 10 a 22 mm. Neste trabalho, para *L. casei* até a concentração de 50%, não se obtiveram resultados superiores quando comparado com a clorexidina. Igualmente pode ser observado para *L. fermentum*. Para estas bactérias somente nas mais altas concentrações obteve-se resultado superior.

Estes resultados mostram que os óleos essenciais de alfavaca e mastruz, podem fazer parte da composição de produtos odontológicos uma vez que apresentaram importantes resultados no combate a bactérias causadoras de infecções bucais. Estudos direcionados ao uso de óleos essenciais como *O. campechianum* e *D. ambrosioides* no combate a bactérias causadoras de doenças bucais ainda é escassa a literatura, o que sugere um estudo mais detalhado para seu uso em produtos industriais.

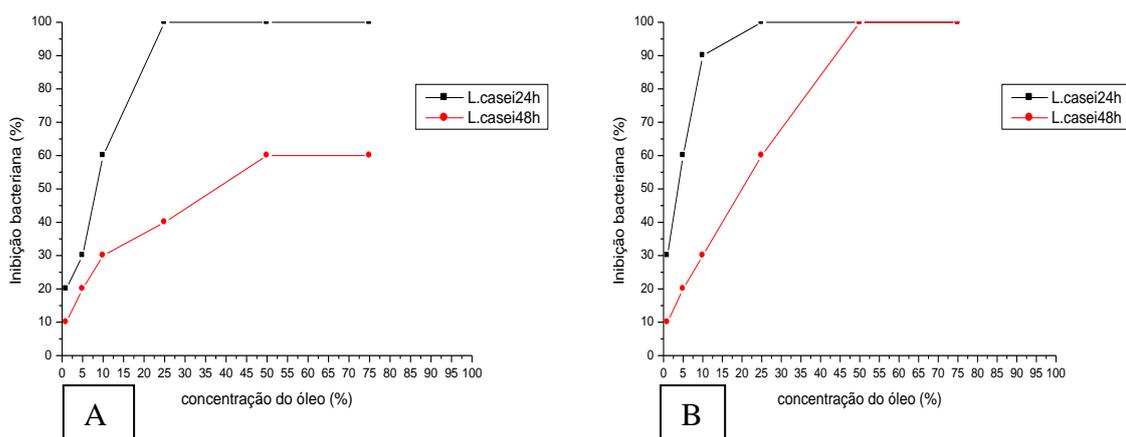
5.3. INIBIÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ÓLEOS OEM E OEA

Plantas aromáticas são importantes fontes para o desenvolvimento de novos fármacos, pois possuem em sua composição substâncias químicas potencialmente úteis para o tratamento de doenças de origem antimicrobiana. A investigação *in vitro* da atividade antimicrobiana destes compostos é o primeiro passo para o desenvolvimento de novos produtos (MAHESH e SATISH, 2008).

Para analisarmos a cinética de ação dos óleos essenciais sobre as cinco espécies de bactérias, foram construídas curvas de crescimento dos microrganismos estudados em relação à inibição frente aos óleos OEA e OEM, como ilustrado nos Gráficos 1, 2, 3, 4 e 5. Pode-se observar que os óleos avaliados apresentaram inibição diante 4 das 5 bactérias estudadas.

O Gráfico 01 apresenta a inibição de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) frente aos óleos OEA e OEM para a bactéria *L. casei*, onde observa-se que OEM apresentou em 24 horas melhor inibição nas concentrações a partir de 10% (90% de inibição) enquanto que o óleo OEA obteve melhor inibição a partir da concentração de 25% (100% de inibição). Em 48 horas de incubação a atividade de ambos os óleos diminuiu, porém o óleo OEM ainda apresentou maior porcentagem de inibição de UFC.

Gráfico 01: Inibição de *L. casei* frente aos óleos OEA e OEM



*A - inibição frente a OEA; B - inibição frente a OEM

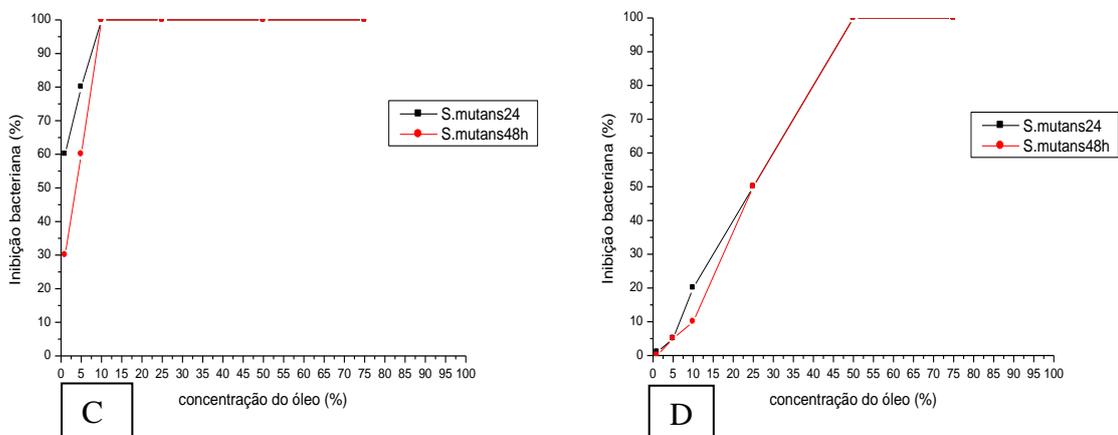
Não há dados na literatura de estudos com os óleos de alfava e de mastruz no combate à microrganismos causadores de doenças odontológicas especificamente. Sendo necessário

buscar na literatura quanto à atividade frente a extratos de plantas aromáticas e óleos de plantas medicinais.

Marreiro, 2011 e colaboradores utilizaram o extrato hidroetanólico e um enxaguatório de *Libidibia ferrea* L. frente a cepas do meio oral, como *L. casei* e avaliou sua ação antibacteriana através do método de microdiluição em microplacas para determinação da concentração mínima capaz de inibir o crescimento bacteriano. Seu estudo mostrou que o extrato apresentou atividade antibacteriana frente *L. casei* na concentração de 4,375 µg/ml.

O Gráfico 02 apresenta a inibição de UFC frente aos óleos OEA e OEM para a bactéria *S. mutans*, onde observa-se que OEA apresentou melhor resultado frente a esta bactéria com 60% de inibição bacteriana na primeira concentração (1%) utilizada do óleo em 24 horas, caindo para 30% após 48 horas de incubação, enquanto que o óleo OEM obteve uma baixa taxa de inibição quando comparado ao OEA (50% de inibição das UFC a uma concentração de 50% de óleo).

Gráfico 02: Inibição de *S. mutans* frente aos óleos OEA e OEM



*C - inibição frente a OEA; D – inibição frente a OEM

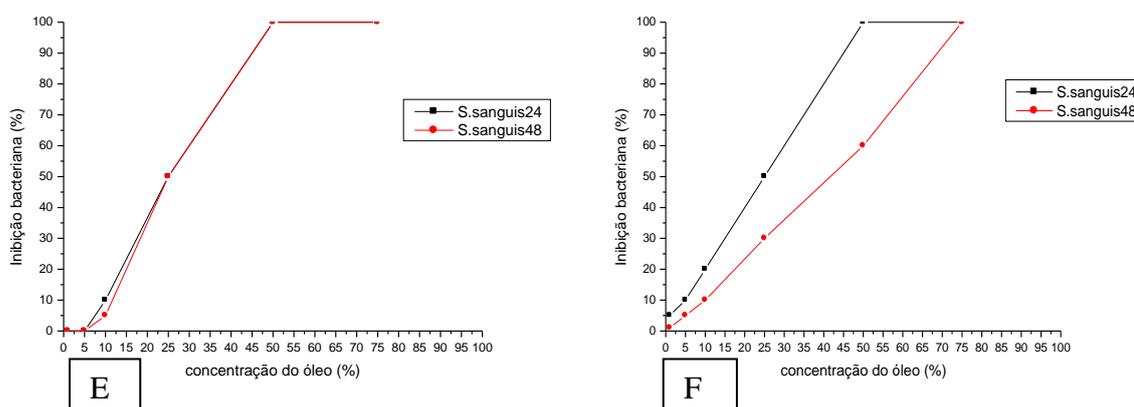
Takarada et al. (2004) e colaboradores encontraram efeito inibitório para *S. mutans* usando óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), assim como demonstrou efeito inibitório no crescimento de bactérias Gram-negativas (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *F. nucleatum*). SILVA, 2011 em estudos com extrato do *Croton sonderianus* encontrou atividade frente à *S. mutans* e outras bactérias alcançando halos de inibição de até 17 mm. Enquanto que NOGUEIRA, 2007 conseguiu halos de 15 mm para extratos de própolis e 25 mm para extrato de citronela.

Em um estudo que avaliou a atividade antimicrobiana de 92 plantas medicinais Hondurenhas, o extrato etanólico de *Piper aduncum* preparado por percolação mostrou a mais ampla efetividade contra fungos e bactérias; no entanto, quando avaliado sobre bactérias orais, não foi capaz de inibir o crescimento do *S. mutans*, mas inibiu o crescimento do *S. sanguis* e de outras bactérias (como *P. intermedia* e *A. Actinomycetemcomitans*) (LENTZ et al., 1998).

Os resultados obtidos neste trabalho para *S. mutans*, mostrou que o óleo essencial de alfavaca em concentração de 1% foi eficaz na inibição do crescimento desta bactéria. Este resultado comprova à possível utilização do óleo na composição de produtos odontológicos, em especial enxaguantes bucais, foco principal para este estudo.

No Gráfico 03 observa-se a inibição de UFC frente aos óleos OEA e OEM para a bactéria *S. sanguis*, onde verifica-se que OEA apresentou baixa inibição até a concentração de 25% de óleo tanto em 24 horas como em 48 horas, apenas as concentrações de 50% e 75% de óleo apresentaram inibição satisfatória de 100%. Igualmente pode ser observado para OEM, para o qual em 24 horas de incubação as concentrações de 50% e 75% foram satisfatórias, porém em 48 horas apenas a concentração de 75% manteve-se com 100% de inibição.

Gráfico 03: Inibição de *S. sanguis* frente aos óleos OEA e OEM

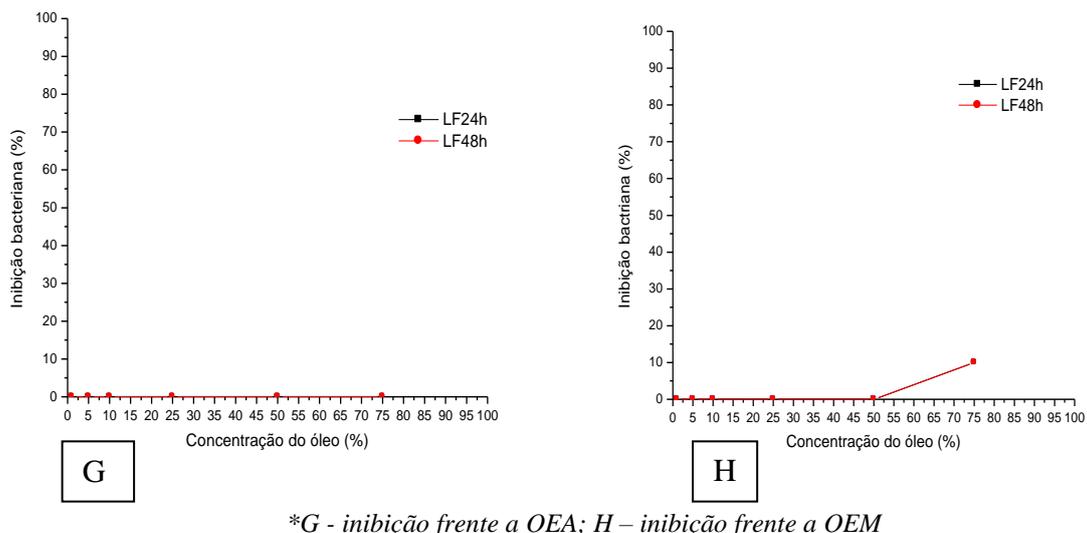


*E - inibição frente a OEA; F - inibição frente a OEM

Magalhães, 2010 estudando extratos etanólicos e hexânicos de *Piper aduncum*, obtidos por quatro diferentes métodos de extração, encontrou ação inibitória contra o *S. sanguis*, sendo que de modo geral, este apresentou-se menos sensível aos extratos estudados pelo autor. O que não se diferencia muito dos resultados obtidos neste trabalho, onde só houve inibição satisfatória (50% de inibição) em altas concentrações dos óleos OEA e OEM.

A susceptibilidade de uma determinada espécie de microrganismo a produtos vegetais oriundos de uma mesma espécie de planta podem apresentar resultados muito diferentes quando avaliada em estudos independentes. Por exemplo, em um estudo que avaliou a atividade antimicrobiana de 92 plantas medicinais hondurenhas, o extrato etanólico de *P. aduncum* preparado por percolação mostrou a mais ampla efetividade contra fungos e bactérias; no entanto, quando avaliado sobre bactérias orais, não foi capaz de inibir o crescimento do *S. mutans*, mas inibiu o crescimento do *S. sanguis* e de outras bactérias (como *F. Nucleatum*, *P. intermedia* e *A. Actinomycetemcomitans*) (LENTZ et al., 1998). Neste trabalho os óleos OEA e OEM foram eficientes para algumas bactérias, porém não foi capaz de inibir o crescimento da bactéria *L. fermentum* que resistiu a ação dos óleos OEA e OEM, não apresentando taxa satisfatória de inibição em nem uma das concentrações avaliadas como pode ser observado no Gráfico 04.

Gráfico 04: Inibição de *L. fermentum* frente aos óleos OEA e OEM



Nos ensaios de inibição das UFC frente aos óleos OEA e OEM para a bactéria *A. actinomycetemcomitans* observou-se que os dois óleos foram eficientes na inibição de 100% das UFC a partir da concentração de 1% do óleo. Estes resultados sugerem que os óleos estudados possuem potencial ação frente a estes microrganismos, podendo ser parte da composição de produtos odontológicos. Esta bactéria é uma das percussoras na causa da doença periodontal, e estes resultados apresentaram-se de grande valia para o combate destes microrganismos utilizando produtos naturais na composição dos produtos. Estes resultados

também supõem que valores de concentrações mais baixas possam apresentar igual atividade inibitória.

Para avaliar *in vitro* a suscetibilidade dos microrganismos *A. actinomycetemcomitans* e *Prevotella intermedia* ao óleo essencial de melaleuca, Hammer et al. (2003) observaram que o óleo essencial a 0,5% elimina as bactérias em 30 segundos e que concentrações inferiores possuem ação bacteriostática. Os autores salientaram que esse efeito não pode ser diretamente refletido para estudos *in vivo*, uma vez que pesquisas testando outros antibacterianos com bons resultados *in vitro* não demonstraram o mesmo desempenho *in vivo*, concluindo que há necessidade de mais trabalhos *in vivo* para determinar a concentração de óleo essencial eficaz.

A evolução da lesão de cárie depende principalmente da capacidade de diminuir as concentrações de íons hidrogênio (ácidos) e de aumentar as concentrações de flúor por métodos tópicos. Se estes dois fatores são favoráveis, as lesões de cárie iniciais podem ser inibidas ou remineralizadas (HENNEQUIN, 1999). A cárie é o resultado da desmineralização do esmalte através da produção de ácido por produtos fermentados pelas bactérias da placa (PERCIVAL et al.,2006). Então agentes anticáries que reduzam a proliferação de bactérias acidogênicas, seriam favoráveis para diminuir a virulência do biofilme dental, o que parece acontecer durante os testes *in vitro* na presença dos óleos essenciais estudados. É importante ressaltar que o segredo do processo de desmineralização-remineralização do dente está no controle do biofilme que o envolve, sendo exatamente essa a principal ideia para o desenvolvimento de um produto eficiente de uso frequente como um enxaguante bucal.

6. CONCLUSÃO

- O óleo de alfavaca inibiu a bactéria *S. mutans*, principal fator etiológico da cárie, em concentração de 1%;
- O óleo de mastruz inibiu *L. casei*, microrganismo que potencializa o processo de cárie, em concentrações a partir de 10%;
- Ambos os óleos essenciais inibiram o crescimento de *A. actinomycetemcomitans*, e podem ser eficazes contra a doença periodontal provocada por esse patógeno.
- É possível sugerir pesquisas direcionadas a isolar substâncias pertencentes aos óleos essenciais das folhas de *D. ambrosioides* e *O. campechianum* para realizar atividades antimicrobianas com essas substâncias.
- As espécies vegetais deste estudo produzem classes de metabólitos secundários com potenciais aplicações na formulação de produtos odontológicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULKADER, A.; DUGUID, R.; SAUDERS, M. E. The antimicrobial activity of endodontic sealers to anaerobic bacteria. *Int. Endod. J.*, v. 29, p. 280- 283, 1996.

ADAMS,R.P.. **Identification of essential oil components by Chromatography/Mass Spectrometry**. 4ª Edição, Editora Allured Books, 2007.

AFFONSO, R. S.; RENNÓ, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. *Rev. Virtual Quim.*, 4 (2), 146-161 , 2012.

AJDIĆ, D.; MCSHAN, W.M.; MCLAUGHLIN, R.E.; SAVIĆ, G.; CHANG, J.; CARSON, M.B., PRIMEAUX, C.; TIAN, R.; KENTON, S.; JIA, H.; LIN, S.; QIAN Y.; LI, S.; ZHU, H.; NAJAR, F.; LAI, H.; WHITE, J.; ROE, B.A.; FERRETTI, J.J. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 99, n. 22, 2002.

AKPATA, E.S.; AKINRIMISI, E.O. Antibacterial activity of extracts from some Africans chewing sticks. *Oral Surg*; p. 717-722; 1997.

ANVISA. Termo de Cooperação nº 37- Agência Nacional de vigilância Sanitária. Controle Interno da qualidade para testes de sensibilidade antimicrobianos, março de 2006. **Manual de testes antimicrobianos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/manuais/manual_testes_antimicrobianos.pdf> acesso em 02 de junho de 2014.

BALANDRIN, et al. Natural plant chemicals sources of industrial and medicinal materials. *Science* v.228, p. 1154, 1985.

BARBIERI, D.S.V. **Análise da aderência “in vitro” de *S. mutans* e *Candida albicans* na superfície dentária**. Dissertação de Mestrado -Universidade Federal do Paraná, Curitiba.p.92, 2005.

BARBOSA, D.A..**Avaliação fitoquímica e farmacológica de *genipa americana* L. (rubiaceae)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2008.

BAGAMBOULA CF, UYTTENDAELE M, DEBEVERE J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiol.* v.21, p. 33-42; 2004.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk metodo. *American Journal of Clinical Pathology*, v.45, n.4, p.493-496, 1966.

BLANK, A.F.; et al.Characterização morfológica e agrônômica de acessos de manjeriço e alfavaca. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.22, n.1, p. 113-116, jan-mar 2004.

BRAILSFORD,S.R.;et al. The predominant aciduric microflora of root-caries lesions. **J.**

Dent. Res., V.80, 1828-33, 2001.

BRAHIM M. A. S., FADLI M., HASSANI L., BOULAYC B., MARKOUKA M., BEKKOUCHEA K., ABBADA A. **Chenopodium ambrosioides var. ambrosioides used in Moroccan traditional medicine can enhance the antimicrobial activity of conventional antibiotics**; *Industrial Crops and Products* 71, 37–43, 2015.

BRASIL 2006. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 971**, de 3 de maio de 2006.

BRASIL 2004. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária **Resolução da Diretoria Colegiada RDC n.48**, de 16 de Março de 2004.

BRASIL 2009. Ministério da Saúde. **RENISUS – Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Visualizado em agosto de 2014.

BORBA, A.M., MACEDO M.; Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil **Acta bot. bras.** 20(4): 771-782. 2006.

BROEKAERT, W. F., CAMMUE, B. P. A., VANDERLEYDEN, J. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiology Letters**, **69**: 61-66. 1990.

BRITO M. V. H.; CARVALHO D. da S. ; ALBUQUERQUE A. M. M. EFEITO DO EXTRATO DE MASTRUZ EM CULTURAS DE *Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli*. **Revista Paraense de Medicina**. V.21 (1) janeiro-março 2007.

BUFFA FILHO, W. *et al* . Indução de Metabólitos Bioativos em Culturas de Células de *Maytenus Ilicifolia*. **Eclet. Quím.**, São Paulo, v. 27, n. spe, 2002.

BUFFON M.C.M.; et al. Avaliação da eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calendula officinalis*, *Plantago major* e *Curcuma zedoaria* no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo “in vitro”. **Revista Visão Acadêmica**; 2: 31-38. 2001

BUGNO, A.; et al., M. T. Enxaguatórios bucais: avaliação da eficácia antimicrobiana de produtos comercialmente disponíveis / Mouthwashes: antimicrobial efficacy assessment in commercially available products. **Rev. odontol. Univ. Cid. Sao Paulo**; 16(3):247-254, set.-dez. 2004.

BURNET, G. W., SCHERP, H. W., SCHUSTER, G. S. **Microbiologia oral & doenças infecciosas**. 4. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978.

CARLSSON, P.; OLSSON, B.; BRATTHALL, D. The relationship between the bacterium *Streptococcus mutans* in the saliva and dental caries in children in Mozambique. **Arch. Oral Biol.**, v.30, n.3, p.265-268, 1985.

CARNEIRO, A. L. B. *et al.* Screening of Amazonian plants from the Adolpho Ducke forest reserve, Manaus, state of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n1, p.31-38, february, 2008.

CAROVIC´-STANKO A. K.; S. ORLIC´ B, S.; POLITEO C. O.; STRIKIC´ D F.; KOLAK A. I.; MILOS C.M.; SATOVIC, Z .Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. **Food Chemistry** , v. 119,196–201, 2010.

CARVALHO FILHO JLS; BLANK AF; ALVES PB; EHLERT PAD; MELO AS; CAVALCANTI SCH; ARRIGONI-BLANK MF; SILVAMANN R.. **Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*; 16: 24-30. 2006.

CASTRO, A.C; NASCIMENTO, A.R; TELES, A.M.; MOUCHREK FILHO, V.E..**Atividade antimicrobiana do óleo essencial de Alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas.** 53º Congresso Brasileiro de Química, Rio de Janeiro; outubro, 2013.

CAVALLI, J.F., TOMI, F., BERNARDINI, A.F., CASANOVA, J. Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC–MS and ¹³CNMR spectroscopy: quantitative determination of ascaridole, a heatsensitive compound. **Phytochemical Analysis**; 15, 275–279; 2004.

CHAAR,J.S. et al. CHIERICE,G.O. Boiling temperatures and enthalpy changes of essential oils using capillary glass sample holder. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Vol. 75, 437–443, 2004.

CERQUEIRA, M. D.;NETA, L. C. S.; PASSOS, M. G. V. M.; LIMA, E. O.; ROQUE, N. F. ; MARTINS, D.; GUEDES, M. L.S.; CRUZ, F. G.- Seasonal Variation and Antimicrobial Activity of *Myrciamyrtifolia* Essential Oils. **Journal of the Brazilian Chemical Society**.,998, 2007.

CHAVES FCM.. **Produção de biomassa, rendimento e composição de óleo essencial de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) em função da adubação orgânica e épocas de colheita.** Botucatu: UNESP. 144p (Tese doutorado); 2002.

CLARK, J.K. On the bacterial factor in the aetology of dental caries. **Br J. Exp. Path**, v. 5; p.141-147, 1924.

CONSTANTIN M.B., SARTORELLI P., LIMBERGER R., HENRIQUES A.T., STEPPE M., FERREIRA M.J.P., OHARA M.T., EMERENCIANO V.P., KATO M.J. Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: antimicrobial activities and analysis by CG/MS and C-NMR. *Planta Med* 63: 771-773; 2001.

CORTELLI, S.C.;CORTELLI,J.R.; JORGE, A.O.C.Relação entre parâmetros clínicos, Fumo e presença de *actinobacillus Actinomycetemcomitans* em indivíduos com periodontite crônica **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, 30(2): 201-214, 2001

CRUZ G.V.B. et. al Nascimento Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**; 111, 148–154, 2006.

CRUZ W. C.; MOURA P. P. R.; HABITANTE S. M.; JORGE N. Z. A. O. C.. Avaliação do efeito antibacteriano in vitro dos cimentos obturadores rickert, n-rickert e sealer 26. **Rev. biociênc.**, Taubaté, v.7, n.1, p.49-53, jan.-jun.2001.

CYSNE JB, CANUTO KM, PESSOA ODL, NUNES EP, SILVEIRA ER. Leaf essential oils of four *Piper* species from the State of Ceará - Northeast of Brazil *J Braz Chem Soc* 16(6B): 1378-1381. 2005.

DE MAN, J.D., ROGOSA, M., a. SHARPE, M.E.: A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. **J. Appl. Bact.**, 23; 130-135; 1960.

DE MEDEIROS M.G.F., DA SILVA A.C., CITO A.M.G.L., BORGES A.R., DE LIMA S.G., LOPES J.A.D., FIQUEIREDO R.C.B.Q. *In vitro* antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology.**; v.60; p. 237-41; 2011.

DISTASI L.C., HIRUMA-LIMA C.A.; 2002. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2.ed. São Paul: Editora Unesp.

DOMINGO, D. LÓPEZ-BREA, M. Plantas com acción antimicrobiana. Madrid. **Rev. Esp. Quimioterap.**, v.16, n.4, p. 385-393, 2003.

DRUMOND, M. R. S; CASTRO, R. D.; ALMEIDA, R. V. D.; PEREIRA, M. S. V.; PADILHA, W. W. N. Estudo Comparativo in vitro da Atividade Antimicrobiana de Produtos Fitoterápicos Sobre Bactérias Cariogênicas. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr.**; v. 4, n. 1, p. 33-38, João Pessoa; jan./abr, 2004.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multiciência**, # 7, out. 2006.

DUBEY, N.K., TIWARI, T.N., MANDIN, D., ANDRIAMBOAVONJY, H., CHAUMONT, J.P.. **Antifungal properties of Ocimum gratissimum essential oil (ethyl cinnamate chemotype)**. *Fitoterapia* 71, 567 a 569, 2000.

ELISABETSKY, E.. Etnofarmacologia. **Cienc. Cult.**; vol.55, n.3, pp. 35-36; 2003.

ETO, F.S.; RASLAN, S.A.; CORTELL, J. R. Características microbianas na saúde e doença periodontal. **Rev. biociênc.**, Taubaté, v.9, n.2, p.45-51, abr-jun 2003.

FABER, J.. Halitose. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial**. Maringá, v. 14, n. 3, p. 14-15, maio/jun. 2009.

FACH A., GREGEL B., SIMIONATTO E, DA SILVA U.F., ZANATTA N, MOREL A.F., LINARES C.E., ALVES S.H. Chemical analysis and antifungal activity of the essential oil of *Calea clematidea*. *Planta Med* 68: 836-839; 2002.

FIGUEIREDO, P.L.B. BICHARA JUNIOR, T.W. SILVA, S.G. NASCIMENTO, L.D. ANDRADE, E.H.A MAIA, J.G.S.. **Composição química dos voláteis das folhas, ramos e inflorescência de Ocimum campechianum (Lamiaceae) por HD e DES**. Trabalho apresentado no 54º congresso brasileiro de química, 2014.

FILOGÔNIO, CFB; PENIDO, C.V.S.; Resende, R.V.; CRUZ, R.A. A Efetividade de Óleos Essenciais no Controle Químico do Biofilme e na Prevenção da Cárie Dentária. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, João Pessoa, 11(3):465-69, jul./set., 2011.

GADANO, A. B.; GURNI, A. A.; CARBALLO, M. A. Argentine folk medicine: Genotoxic effects of Chenopodiaceae family. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 103, p. 246-251, 2006.

GEBARA, E.C.E.; ZARDETTO, C.G.D.C., MAYER, M.P.A. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. **Rev Odontol Univ São Paulo**; v. 10; p. 251-256; 1996.

GUPTA, D.; CHARLES, R., MEHTA, V. K.; GARG, S. N.; KUMAR, S. Chemical examination of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. from the southern hills of India. **Journal of Essential Oil Research**, v.14, n.2, p.93- 94, 2002.

HAMADA, S.; MICHALEK, S.; KIYONO, H.; MENAKER, L.; MCGHEE, J. Overview of the biology of *Streptococcus mutans*. In: Molecular microbiology and immunobiology of *Streptococcus mutans*. **Elsevier Science Publishing Inc.**, New York; p.7-20, 1986.

HAMMER, K.A. et al. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro. **Oral Microbiology and Immunology**, v.18, p.389-92, 2003.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today** v.5, p. 294, 2000.

HENNEQUIN M.. **Dynamique du processus carieux initial**. *Real Clin*;10; 483-501; 1999.

HUME, W. R. Na análise da liberação e da difusão através da dentina de eugenol de misturas de óxido de zinco-eugenol. **J. Dent. Res.**, v. 63, p. 881-884, 1984.

IULIANA RMB, BRIQUES W. Halitose: conceitos básicos sobre, diagnóstico, microbiologia, causas, tratamento. Anais do 15º Conclave Odontológico Internacional de Campinas - n.104 - mar/abr - 2003.

JARDIM, I.M.; Reparação de feridas cutâneas de camungongos tratadas com óleo de pimenta longa, *Piper hispidinervum* C.DC. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 9, n. 1, p. 258-276, jan./jul. 2011.

JOHNSON, M. A.; CROTEAU, R. Biosynthesis of ascaridole: iodide peroxidase-catalyzed synthesis of a monoterpene endoperoxide in soluble extracts of *Chenopodium ambrosioides* fruit. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.235, p.254–266, 1984.

JORGE, A. O. C. **Microbiologia Bucal**. Livraria Editora Santos, 2ª ed. São Paulo, 121p., 1998.

KERROLA K; GALAMBOSI B; KALLIO H. 1994. **Volatile components and odor intensity of four phenotypes of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.)**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 42: 776-781.

KOKETSU, M.; GONÇALVES, S.L. **Óleos essenciais e sua extração por arraste a vapor**. 24p.; EMBRAPA-CTAA, Rio de Janeiro, , 1991.

KOLENBRANDER, P. E. Oral microbial communities: biofilms, interactions and genetic systems. **Annual Rev. Microbiol.**, v.54,p.413-437, 2000.

KORDALI S, ÇAKIR A, ÖZER H, ÇAKMAKCI R, KESDEK M, METE E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. **Bioresour Technol.** v.99; p.8788–95; 2008.

KUMAR R., MISHRA A. K.; DUBEY, N.K.; TRIPATHI, Y.B.. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, anti-aflatoxinogenic and antioxidant activity. **International Journal of Food Microbiology**, 115, 159–164, 2007.

LASCALA N.T.. **Promoção de saúde bucal**. 1. ed. São Paulo: Editora Artes Médicas Ltda., 1997.

LEITE, J.P.V.; **Fitoterapia: Bases científicas e tecnológicas**. Editora: Atheneu, 2009.

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

LEMOS, J. A. et al. **Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. towards *Cryptococcus neoformans***. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.100, n.1, p.

LENTZ, D.L; CLARK, A.M; HUFFORD, C.D; MEURER-GRIMES, B; PASSREITER, C.M; CORDERO, J; IBRAHIMI, O; OKUNADE, A.L. **Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 63, p. 253-263. 1998.

LINDHE, J. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 4, p. 92-126, 1999.

LOESCHE, W. J., E SYED, S.A. Bacteriology of human experimental gingivitis: effect of plaque and gingivitis score. **Infect. Immun.**, n. 21, p. 830-839, 1978.

MACDONALD, D. Ascaridole-less infusions of *Chenopodium ambrosioides* contain a nematocide(s) that is (are) not toxic to mammalian smooth muscle. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 92, p. 215-221, 2004

MACEDO-COSTA MR. **Atividade antimicrobiana e antiaderente de *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poir e *Myrciaria cauliflora* Berg sobre bactérias do biofilme dental**. João Pessoa 95p. Monografia (Graduação em Odontologia) – Universidade Federal da Paraíba. 2008.

MAGALHÃES, C.F. **Efeito de extratos e frações de *Piper aduncum* sobre o crescimento e metabolismo dos *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis***. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Vale do Rio Doce. Governador Valadares; Março, 2010.

MAHESH, B.; SATISH, S. Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. **World J. Agric. Sci.**, v. 4, p. 839-843, 2008.

MAIA, A. I. V.; TORRES, M.C. M.; PESSOA, O. D. L.; MENEZES, J E S. A.; COSTA, S. M. O.; NOGUEIRA, V. L. R.; MELO, V. M. M.; SOUZA E. B.; CAVALCANTE, M. G. B.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R. Óleos essenciais das folhas de *Vernonia Remotiflora* e *Vernonia Brasiliana*: composição química e atividade biológica. **Quím. Nova**, vol.33 no.3 São Paulo, 2010.

MANJI, F.; FEJERSKOV, O. Dental caries in developing countries in relation to the appropriate use of fluoride. **J Dent Res.**, n. 69, p. 733-741, 1990.

MARREIRO, R.O. **Caesalpinia ferrea L.: Avaliação da atividade antimicrobiana, controle de qualidade e compatibilidade biológica de uma formulação de enxaguatório bucal.** . Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa Saúde Sociedade e Endemias da Amazônia – UFAM; 2011.

MARTÍNEZ, P. H.; MIRANDA, B.E.L.; SANTOS, F.S. Antibacterial effects of commercial essential oils over locally prevalent pathogenic strains in Mexico / **Fitoterapia** v.76, p453-457, 2005.

MÁRTON IJ. How does the periapical inflammatory process compromise general health **Endodontic Topics.**; 8: 3-14; 2004.

MATTOS-GRANER, R. O., S. JIN, W. F. KING, T. CHEN, D. J. SMITH, AND M. J. DUNCAN. Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. **Infect. Immun.** v.69, p.6931-6941, 2001.

MATOS J.A.L., **Potencial biológico de *Chenopodium Ambrosioides* (erva de santa-maria).** Dissertação de mestrado, Faculdade Fernando Pessoa. Porto, 2011.

MAZZAFERA, P.; Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasil. Bot.**, V.26, n.2, p.231-238, jun. 2003.

MENDES, B.G.; MACHADO, M.J.; FALKENBERG, M.; Triagem de glicolipídios em plantas medicinais. **Rev. Bras Farmacogn.** 16: 568-575; 2006.

MENEZES, M. C. SOUZA, M. M. S, BOTELHO, R. P. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de extratos de plantas brasileiras sobre bactérias isoladas da cavidade oral de cães. **Rev. Univ. Rural, Ser. Ci. Seropédica**, Rio de Janeiro EDUR, v. 24, n. 2, p. 141-144, jul – dez, 2004.

MEZA, D. M.; HENRÍQUEZ H. B.; MARTÍNEZ, M. E. T.; **Actividad acaricida del aceite esencial de la corteza de *Croton malambo* H. Karst, metil-eugenol y metil-isoegenol contra *Dermatophagoides farinae* Hughes, 1961** Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 13 (6): 537 – 544, 2014.

MIGUEL, MD, MIGUEL, OG 1999. **Desenvolvimento de fitoterápicos.** São Paulo: Editora Robe.

MONTANARO, L.; CAMPOCCIA, D.; RIZZI, S.; DONATI, M. E.; BRESCHI, L.; PRATI, C.; ARCIOLA, C. R. Evolution of bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* on dental restorative materials. **Biomaterials**, v.25, p.4457-4463, 2004.

MONZOTE L., MONTALVO M.A., R. SCULL, MIRANDA M., ABREU J. Activity, toxicity and analysis of resistance of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* after intraperitoneal, oral and intralesional administration in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*: A preliminary study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. 61 148-153, 2007.

MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27; p. 4050-4063, 2009.

MORALES, M.R., CHARLES, D.J., SIMON, J.E., 1993. **New aromatic lemon basil germplasm**. In: Janick, J., Simon, J. (Eds.), *New Crops*. Wiley, New York, pp. 632 a 635, 1993.

MOREIRA, A. N. et al.. Agentes antimicrobianos no controle da placa supragengival. **Arq. Odontol**; v: 37 (1); p. 87-98; jan.-jun, 2001.

MOREIRA, M. **Variabilidade genética de *Streptococcus mutans* em isolados intrafamiliares, por meio de marcadores RAPD**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 80p., 2006.

MORAN, J.; ADDY, M.; NEWCOMBE, R.G.; MARLON, I. A Study to assess the plaque inhibitory action of newly formulated triclosan toothpaste. **J Clin Periodontol**; v. 28; p. 86-89; 2001.

MOORE, W. E. C. E MOORE, L. V. H. The bacteria of periodontal diseases. **Periodontol.**, n. 5, p. 66-77, 1994; 2000

MOTA, M.V.A. et al. Estudo comparativo in vivo da eficácia de dois enxagatatórios bucais sobre a formação da placa bacteriana supragengival - plano piloto. **Rev. odontol. Univ. Cid. Sao Paulo**; 16(3):247-254, set.-dez. 2004.

MOURA, C.L. **Avaliação das atividades antimicrobianas dos extratos brutos das espécies vegetais *Puffia glomerata* e *Miconia Rubiginosa* em microorganismos da cavidade bucal**. Dissertação (mestrado em Promoção de saúde); Universidade de Franca; 71f, 2006.

MUHAYIMANA, A.; CHALCHAT, J. C.; GARRY, R. P. Chemical composition of essential oils of *Chenopodium ambrosioides* L. from Rwanda. **Journal of Essential Oil Research**, v.10, n.6, p.690-692, 1998.

NAKAMURA, C.V. et al. **Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.94, n.5, p. 675-678, 1997.

NASCIMENTO E. M. et al.. **Composição química e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* (Chenopodiaceae)**. Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009.

NASCIMENTO P. F.C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia/ Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 17(1): 108-113, Jan./Mar., 2007.

NAVARRETE, A.; WALLRAF, S.; MATO, R. B.; COCERO, M. J. Improvement of Essential Oil Steam Distillation by Microwave Pretreatment. **I&EC Research**, v. 50, p. 4667-4671, 2011.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), 2000. Padronização dos testes de sensibilidade antimicrobianos por disco-difusão- 8ª Edição, V.23, nº1, janeiro de 2003.

NOCACOSK, R.; TORRES, R. S. L. A. Atividade antimicrobiana sinérgica entre óleos essenciais de lavanda (*Lavandula officinalis*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), cedro (*Juniperus virginiana*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e cravo (*Eugenia caryophyllata*). **Revista Analytica**, n. 21, fevereiro/março 2006.

NOGUEIRA, M.A.; DIAZ, M.G.; TAGAMI, P.M.; LORSCHIDE, J.3. Atividade microbiana de óleos essenciais e extratos de própolis sobre bactérias cariogênicas. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n.1, p.93-97, 2007.

OGATA, M. et al. Cimentos endodônticos: efeito da relação pó/ líquido na ação antimicrobiana. **RGO**, v. 32, n. 3, p. 250-254, jul./ set. 1984.

OZTÜRK, M. Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil. **Food Chem.**; v.134 p. 48–54; 2012.

OLIVEIRA A.C.. **Plantas medicinais utilizadas para problemas bucais: estudo etnobotânico em diferentes biomas da Paraíba**. Monografia (Graduação) – 111pag.; UFPB/CCS. João Pessoa, 2010.

OLIVEIRA A.C.M.; et. al. Emprego do óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Vol.13(4), p.492, 2011.

OLIVEIRA, F.; AKISUE,G.. **Fundamentos de farmacobotânica e morfologia vegetal**, 228p, 3ª edição. Editora Atheneu, São Paulo, 2009.

OLIVEIRA, R.A. de, MOREIRA, I.S.; OLIVEIRA, F.F.. Linalool and methyl chavicol present basil (*Ocimum* sp.) cultivated in Brazil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.15, n.2, p.309-311, 2013.

OLIVEIRA C.B. Avaliação da eficácia da descontaminação de escovas dentárias pelo uso do spray de óleo essencial da *eugenia uniflora* l.(Pitanga). **Cienc. Odontol. Bras**. V. 12 (2); p. 29-34; abr./jun, 2009.

OLIVEIRA, F.Q. et al.Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia.Brazilian Journal of Pharmacognosy**; v.17(3) , P.466-476, Jul./Set. 2007.

OLIVEIRA M. S. A. **Avaliação da atividade antimicrobiana do *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Piper aduncum* (L) E *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. sobre bactérias periodontopatogênicas.** Dissertação de mestrado, Universidade Vale do Rio Doce; Governador Valadares , 2010.

OLIVEIRA JG, ABREU FILHO BA. Propriedade antimicrobiana do eugenol frente às amostras de *Alicyclobacillus* spp. isoladas de suco de laranja. **Rev Inst Adolfo Lutz.** São Paulo; 71(2):410-4.2012.

ONOCHA, P. A.; EKUNDAYO, O.; ERAMO, T.; LAAKSO, I. Essential oil constituents of *Chenopodium ambrosioides* L. leaves from Nigeria. **Journal of Essential Oil Research,** v.11, n.2, p.220-222, 1999.

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

PACHECO M.A.P. **Endocardite bacteriana: revisão de literatura.** Monografia de especialização. Universidade Federal Rural do Semi-Árido; Curitiba -Paraná; 2011.

PAIK, S. et al. Identification of Virulence Determinants for Endocarditis in *Streptococcus sanguinis* by Signature-Tagged Mutagenesis. **American Society for Microbiology.** Infection and immunity , p. 6064–6074 Vol. 73, No. 9, Sept. 2005.

PERCIVAL, R.S; DEVINE, D.A; DUGGAL, M.S; CHARTRON, S; MARSH, P.D. **The effect of cocoa polyphenols on the growth, metabolism, and biofilm formation by 51 *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*.** *European Journal of Oral Sciences,* v. 114, p. 343–348. 2006.

PEREIRA J.V. **Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos formadores de placa bacteriana.** João Pessoa, 92p. Dissertação de Mestrado, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba; 1998.

PERUZZO D.C, et al. Abordagens Atuais para o Tratamento da Gengivite. **RPE - Revista Internacional de Periodontia Clínica;** 2(5):75-80; 2005.

PETTI,S.; HAUSEN, H. W. Caries prediction by multiple *Salivary mutans streptococcal* counts in caries-free children with different levels of fluoride exposure, oral hygiene and sucrose intake. **Caries Res.,** v.34, p.380-387. 2000.

PIERI, F.A.1*; MUSSI, M.C.2; MOREIRA, M.A.S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Rev. Bras. Pl. Med.,** Botucatu, v.11, n.4, p.465-472, 2009.

POULOUSE A.J., CROTEAU R. Biosynthesis of Aromatic Monoterpenes Conversion of γ Terpinene to p-Cymene and Thymol in *Thymus vulgaris* L. **Arch Biochem Biophys.** v.187; p. 307-14. 1978;

QUIRYNEN, M.; VOGELS, R. Clinical relevance of surface characteristics on the formation of plaque on teeth and implants. **Ned Tijdschr Tandheelkd.** v. 109, n. 11, p. 422-29, 2002.

RAMOS, I. A.; LEITE, R.B.; DE MENEZES, K. M.. Efeito inibitório de enxaguatórios bucais sobre o crescimento de Lactobacilos casei. **Rev. bras. odontol.**, Rio de Janeiro, v. 69, n. 1, p. 107-10, jan./jun. 2012.

REYNERTSON K.A.; WALLACE, AM; GIL, RR; YANG H.; BASILE MJ; DARMIETO J; WEINSTEIN, I.B.; KENNELLY, E.J. **Bioactive depsides and anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*)**. *J Nat Prod* 69: 1228-30. 2006.

RIO A. C. C., NICOLA ,E. M. D.; TEIXEIRA, A. R. F. Halitose: proposta de um protocolo de avaliação. **Rev Bras Otorrinolaringol**;73(6):835-42, 2007.

RONDELLI V.M., COSTA A.V.; QUEIROZ V. T., PINHEIRO P. F.; PRATISSOLI D. **Composição química e avaliação do potencial inseticida do óleo essencial de *chenopodium ambrosioides* no controle de *frankliniella schultzei***. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p.2450, Nov., 2012.

ROSA, O. P. S.; ROCHA, R. S. S. Clorexidina e cárie dentária. **Cecade News**, Bauru,v.1, n. 1/2, p.1-24, jan/ago. 1993.

ROSADO, L.D.S.; PINTO, J.E.B.P.; BOTREL, P.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; NICULAU, E.S.; ALVES, P.B. Influência do processamento da folha e tipo de secagem no teor e composição química do óleo essencial de manjerição cv. Maria Bonita. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.2, p.291-296, 2011.

ROSAN, B.; LAMONT, R. J. Dental plaque formation. *Microbes and infection*, n. 2, p. 1599-1607, 2000.

SANTANA MF, QUINTANS-JÚNIOR LJ, CAVALCANTI SCH, OLIVEIRA MGB, GUIMARÃES AG, CUNHA ES, MELO MS, SANTOS MRV, ARAÚJO AAS, BONJARDIM LR. p-cymene redices orofacialnociceptive response in mice. **Rev Bras Farmacogn**; v.8, p.1138-43; 2011.

SANTOS, A.S.; ALVES S. DE M.; FIGUEIRÊDO F. J. C.; ROCHA N.O.G. **Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório**. Comunicado Técnico, EMBRAPA, Ministério da Agricultura e Abastecimento, Belém-Pa, novembro de 2004.

SANTOS, R.S.I.; PEREIRA, D.F.A.; TEODORO, G.R.; CANETTIREI, A.C.V.; KHOURI, S.; SALVADOR, M.J. **Avaliação da atividade antibacteriana e determinação da CIM do óleo essencial de *Thymus vulgaris* sobre *Streptococcus mutans* e caracterização química do óleo por cromatografia gasosa**. XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. Visto em < www.inicepg.univap.br/cd/inic_2007/trabalhos/saude/inic> Acesso em 16 de abril de 2014.

SCHIMID, W.. The micronucleus test. **Mutationos researt** 31, 9-15.1975.

SÉRVIO E. M. L. et al.; Cicatrização de feridas com a utilização do extrato de *Chenopodium ambrosioides* (mastruz) e cobertura secundária estéril de gaze em ratos. Universidade nove de Julho. Brasil. **Conscientiae saúde**, v.10, nº3, pp 441-448, 2011.

SHEN S., SAMARANAYAKE L.P., YIP H.K. In vitro growth, acidogenicity and cariogenicity of predominant human root caries flora. **Journal of Dentistry**;32:667-78; 2004.

SILNESS, J.; LOE; H.. Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. **Acta Odontologica Scandinavica**, V.22, 121-135, 1964.

SIMON, J.E., QUINN, J., MURRAY, R.G., **Basil: a source of essential oils**. In: Janick, J., Simon, J.E. (Eds.), *Advanced in New Crops*. Timber Press, Portland, OR; 484e489, 1999.

SILVA, J.P.C . **Avaliação in vitro da atividade de extratos de Plantas da amazônia e mata atlântica frente à *Streptococcus mutans* e à *streptococcus Sanguinis***. Dissertação de mestrado. UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP. São Paulo, 2009.

SILVA V.A., OLIVEIRA C.R.M., FREITAS A.F.R., COSTA M.R.M., PESSÔA H.L.F., PEREIRA M.S.V. Eficácia antimicrobiana do extrato do *Croton sonderianus* Müll. sobre bactérias causadoras da cárie dentária. **Rev Odontol**. UNESP; v. 40(2); p. 69-72; 2011.

SIMÕES, C.M.O; GUERRA, M.P. [et al.] **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5^a ed. rev. ampl., primeira reimpressão – Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 1102p., 2004.

SIMÕES, C.M.O.; SHENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação entre indústria e academia. **Revista brasileira de farmacologia**, v.12, n1, pag.35-40; 2002.

SINGH N.P., MCCOY M.T., TICE R.R., SCHNEIDER E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, 184-191, 1988.

SOARES D.; ANDRADE C.; PINTO A. R.; SEABRA M.; MACHO V. Doenças da gengiva e periodonto em crianças e adolescentes. Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto. **Acta Pediatr Port**: 40(1): 23-29; 2009.

SOARES, M.M.S.R.; CURY, A.E. In vitro activity of antifungal and antiseptic agents against dermatophyte isolates from patients with tinea pedis. **Braz. J. Microbiol.**, v.32, p.130-134, 2001.

SUFFREDINI I.B, PACIENCIA M.L.B, VARELLA A.D., YOUNES R.N. Antibacterial Activity of Brazilian Amazon Plant Extracts. **Braz. J. Infect. Dis.**, Salvador, v.10, n.6, p. 400-402, 2006.

TAKARADA, K. et al. A comparasion of the antibacterial efficacies of essential oils agaist oral pathogens. **Oral Microbiology and Immunology**, v.19, p.61-4, 2004.

TASSOU C.C, KOUTSOUMANIS K., NYCHAS G.J.E. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. **Food Research International** 33: 273-280; 2000.

TIPPAYATUM P, CHONHENCHOB V. Antibacterial activities of thymol, eugenol and nisin against some food spoilage bacteria. **Nat Sci.**;41:319-23; 2007.

UFSC, **Alfavaca**. Horto Didático do Hospital Universitário de Santa Catarina. <<http://www.hortomedicinaldohu.ufsc.br/planta.php?id=161>>. Visto em 01 de setembro de 2014.

ULTEE, A., GORRIS, L.G.M. AND SMID, E.J., **J. Applied Microbiology**, 85(2), 211, 1998

UZEDA, M. **Microbiologia Oral: etiologia da cárie, doença periodontal e infecções endodônticas**. .104p, Medsi. Rio de Janeiro, 2002.

VIEIRA, R.F., SIMON, J.E.. Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp.) found in the markets and used in traditional medicine in Brazil. **Econ. Bot.**; v. 54, 207-216, 2000.

VIEIRA, R. F., GRAYER, R. J., PATON, A., SIMON, J. E. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. **Biochem. Systemat. Ecol.**, v.29, p.287-304, 2001.

WATERMAN, P. G. The chemistry of volatile oils. In: HAY, R.K.M., WATERMAN, P.G. Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production. **Essex: Longman Group**, p.41-61, 1993.

WEI, L., YU, L., XUE-ZHI, Z., NING, L., HONG, C. In vitro bactericidal activity of Jinghua Weikang capsule and its individual herb *Chenopodium ambrosioides* L. against antibiotic-resistant *Helicobacter Pylori*. **Chin J. Integr. Med.** v. 19, n. 1, p. 54-57, 2013.

WILLERSHAUSEN, B; GRUBER, I; HAMM, G. Índice de placa e sangramentos gengivais: a influência de ingredientes herbários. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent** ; 48(3):1335-40, maio-jun. 1994.

ZAMBON, J. J.; SLOTS,J.; GENCO, R. J. Serology of Oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and Serotype Distribution in Human Periodontal Disease. **Infection and immunity**, v.41; p. 19-27; 1983.

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; Curitiba, Jan. – Jun., 2007.