

UNIVERSIDADE DE UBERABA
PROPEPE – PRO-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E EXTENSÃO
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

ANDRÉA MARIA PASQUINI ALVARENGA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIFÚNGICA DO DERIVADO VEGETAL DE
Pelargonium graveolens NO CONTROLE DE CEPAS PADRÃO
DE *Streptococcus mutans* E *Candida albicans***

UBERABA, MG

2013

ANDRÉA MARIA PASQUINI ALVARENGA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIFÚNGICA DO DERIVADO VEGETAL DE
Pelargonium graveolens NO CONTROLE DE CEPAS PADRÃO
DE *Streptococcus mutans* E *Candida albicans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Uberaba - UNIUBE, área de concentração: Biopatologia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino

UBERABA, MG

2013

Alvarenga, Andréa Maria Pasquini,

A86a Atividade microbiana e antifúngica do derivado *Pelargonium graveolens*
no controle de cepas padrão de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*
/ Andréa Maria Pasquini Alvarenga. - 2013.
57 f. , il. -

Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade de Uberaba,
2013

Orientador: Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino

1. Boca - Doenças. 2. Cárie. 3. Streptococcus mutans. 4. Candida
albicans. 5. Fitoterapia. 6. Plantas medicinais. 7. Pelargoneo gaviolens II.
Paulino, Tony de Paiva. III. Título.

CDD 616.31

Ata da Sessão Pública de defesa de dissertação para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Biopatologia, a que se submeteu a aluna Andrea Maria Pasquini Alvarenga – matrícula 6102978, orientada pelo Prof. Tony de Paiva Paulino

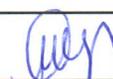
Ao dezenove dia do mês de dezembro do ano de dois mil e treze, às 14 horas, na sala 2C06 da Universidade de Uberaba, reuniu-se a Comissão Julgadora da defesa em epígrafe indicada pelo o Colegiado do Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade de Uberaba, composta pelos Professores Doutores: Tony de Paiva Paulino - **Presidente**, Maria Angélica Hueb de Menezes Oliveira, e Paulo Roberto da Silva para julgar o trabalho da candidata Andrea Maria Pasquini Alvarenga, apresentado sob o título: **“ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIFÚNGICA DO EXTRATO DE PELARGONIO GRAVEOLENS NO CONTROLE DE CEPAS PADRÃO DE S. MUTANS E C. ALBICANS”**. O Presidente declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros da Comissão Julgadora. A seguir a candidata dissertou sobre o seu trabalho e foi argüida pela Comissão Julgadora, tendo a todos respondido às respectivas argüições. Terminada a exposição, a Comissão reuniu-se e deliberou pelo seguinte resultado:

APROVADO

REPROVADO (anexar parecer circunstanciado elaborado pela Comissão Julgadora)

Para fazer jus ao título de MESTRE EM ODONTOLOGIA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO BIOPATOLOGIA, a versão final da dissertação, considerada aprovada devidamente conferida pela Secretaria do Mestrado em Odontologia, deverá ser entregue à Secretaria dentro do prazo de 30 dias, a partir da data da defesa. O aluno Aprovado que não atender a esse prazo será considerado Reprovado. Após a entrega do exemplar definitivo, o resultado será homologado pela Universidade de Uberaba, conferindo título de validade nacional aos aprovados. Nada mais havendo a tratar, O Senhor Presidente declara a sessão encerrada, cujos trabalhos são objeto desta ata, lavrada por mim, que segue assinada pelos Senhores Membros da Comissão Julgadora, pelo Coordenador do Programa de Mestrado em Odontologia da UNIUBE, com ciência da aluna. Uberaba, ao dezenove dia do mês de dezembro de dois mil e treze.

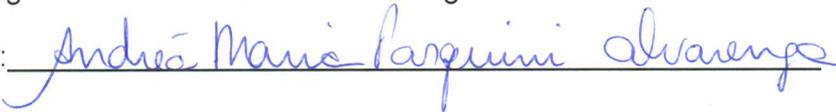
Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino 

Profª.Drª. Maria Angélica Hueb de Menezes Oliveira 

Prof. Dr. Paulo Roberto da Silva 

Prof. Dr. José Bento Alves 
Coordenador do Programa de Mestrado em Odontologia da UNIUBE

Flávia Michele da Silva 
Secretária do Programa de Mestrado em Odontologia da UNIUBE

Ciência da Aluna: 

DEDICATÓRIA

À Deus e Nossa Senhora,
por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos
melhores caminhos, coragem para acreditar, força para
não desistir e proteção para me amparar.

À minha família: meu marido Rogério e minhas
filhas, Manuela e Isabela, pelo amor, apoio, confiança e
motivação incondicional. Que sempre me impulsiona em
direção às vitórias dos meus desafios.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino, pela confiança, pelo incentivo e dedicação, pela infinita disponibilidade, por todos os ensinamentos e pela impecável condução deste meu trabalho.

Aos professores doutores deste curso de mestrado, Luciano, Denise, Geraldo, Sanívia, Elisângela, o meu muito obrigado pelos ensinamentos e crescimento profissional.

Ao pró-reitor Prof. Dr. José Bento que nos proporcionou esta oportunidade deste curso de mestrado e nos auxiliou sempre que necessitamos de sua ajuda.

Às minhas colegas Célia e Maria Auxiliadora, verdadeiras companheiras de pesquisa, sempre gentis, alegres e presentes.

À meu marido, Rogério, quem sempre me incentivou.

Aos meus GRANDES AMORES, Isabela e Manuela.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

Charles Chaplin

RESUMO

Doenças de origem microbiana que acometem a cavidade bucal são hoje uma preocupação de saúde pública, entre as doenças mais comuns pode-se citar a cárie e a candidíase bucal em suas diferentes formas. Na busca de antimicrobianos mais eficazes, a utilização de derivados vegetais na formulação de enxaguatórios bucais tem despertado grande interesse na pesquisa. Enxaguatórios bucais contendo clorexidina são bastante utilizados na higiene bucal, no entanto, vários efeitos adversos são associados à utilização de produtos contendo este composto. Já foi demonstrado que derivados vegetais de *Pelargonium graveolens*, planta popularmente conhecida como malva, apresentam atividades antimicrobianas. No entanto, é pouco estudada, principalmente seus derivados vegetais aquosos. No presente trabalho, foi avaliada a atividade antimicrobiana, antiaderente e antiacidúrica de derivados vegetais de *Pelargonium graveolens* sobre os microrganismos *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, visando à elaboração futura de enxaguatórios bucais. A atividade antimicrobiana dos derivados vegetais foi avaliada em análise de halo de inibição frente às cepas estudadas. Os derivados vegetais analisados apresentaram melhor ação antimicrobiana frente às cepas de *Streptococcus mutans*, onde foi observada a inibição do crescimento bacteriano em todos os volumes contendo os derivados vegetais analisados (4, 8, 16 e 32 μL). A ação antimicrobiana frente às cepas de *Candida albicans* também apresentou características promissoras, embora tenha demonstrado poder de inibição apenas nos volumes maiores de concentração do derivado vegetal (16 e 32 μL). Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que compostos presentes no derivado vegetal de *Pelargonium graveolens* possuem propriedades antimicrobianas contra cepas de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*.

Palavras-chave: *Pelargonium graveolens*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, biofilme.

ABSTRACT

Diseases of microbial origin involving the oral cavity are a public health concern. Among the most common oral diseases we can cite caries and oral candidiasis in its different forms. In the search for more effective antimicrobials, the use of plant extracts in mouthwash formulations has aroused great interest in the research. Mouthwashes containing chlorhexidine are widely used in oral hygiene, however, several adverse effects are associated with the use of products containing this compound. It has been demonstrated that extracts from *Pelargonium graveolens* plant commonly known as mauve, exhibit antimicrobial activity. However, it is poorly understood, particularly their aqueous extracts. In the present study, we evaluated the antimicrobial activity, antiadhesive and antiaciduric of extracts derived from *Pelargonium graveolens* on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*, aimed at future development of mouthwashes. The antimicrobial activity of plant extracts was evaluated by analysis of inhibition zone against the strains studied. The plant extracts tested showed better antimicrobial activity against the *Streptococcus mutans* strains, where the inhibition of bacterial growth was observed in all volumes containing extract (4, 8, 16 e 32 μL). The antimicrobial activity against the *Candida albicans* strains also showed promising characteristics, but has demonstrated the power of inhibition only in the higher volumes of the extract (16 e 32 μL). The results presented here suggest that compounds present in the extract of *Pelargonium graveolens* have antimicrobial properties against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*.

Key words: *Pelargonium graveolens*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Amostras de <i>Pelargonium graveolens</i> utilizadas neste trabalho.....	27
Figura 2	Varição de pH em meio TSB com biofilme de <i>S. mutans</i> ao longo de 4 horas de experimento.....	35
Figura 3	Consumo de glicose pelo biofilme de <i>S. mutans</i> ao longo de 4 horas de experimento.....	36
Figura 4	Consumo de glicose pelo biofilme de <i>C. albicans</i> ao longo de 4 horas de experimento.....	37
Figura 5A	Avaliação qualitativa da formação do biofilme de <i>C. albicans</i>	38
Figura 5B	Avaliação qualitativa da formação do biofilme de <i>S. mutans</i>	38
Figura 6	Análise dos halos de inibição das cepas de <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i>	40
Figura 7	Avaliação qualitativa do ensaio para avaliação de formação do tubo germinativo em <i>C. albicans</i>	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Medidas (cm) do halo de inibição frente às cepas de <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i>	39
----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
ATCC	American Type Culture Collection
TSB	Trypticase Soy Broth
CO ₂	Dióxido de carbono
UFC	Unidade Formadora de Colônia
A	Absorbância
mmol	Milimol
DV	Derivado vegetal
TA	Temperatura ambiente
mg	Miligramas
mm	Milímetro
TSA	Agar Triptona de Soja
CEC	Centre of Biological Engineering
SBF	Serum Bovine Fetal
BHI	Brain Heart Infusion
ASD	Agar Sabouraud Dextrose
g	Grama
h	Hora
min	Minutos
mL	Mililitro
nm	Nanômetros
OD	Optical density
PBS	Phosphate Buffered Saline
µL	Microlitros
µm	Micra
cm	Centímetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 DOENÇAS BUCAIS	16
2.2. CÁRIE E <i>Streptococcus mutans</i>	17
2.3 <i>Candida albicans</i>	19
2.4 ENXAGUATÓRIOS BUCAIS.....	21
2.5 FITOTERAPIA NA SAÚDE PÚBLICA	23
2.6 <i>Pelargonium graveolens</i>	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GERAL	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 CULTIVO, MANUTENÇÃO E COLETA DAS PLANTAS MEDICINAIS	27
4.2 IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DO VEGETAL	27
4.3 PREPARO DAS PLANTAS MEDICINAIS PARA ESTUDO	28
4.4 PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DE <i>Streptococcus mutans</i> E <i>Candida albicans</i> EM MEIO LÍQUIDO	28
4.5 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE GLICOSE DURANTE O CRESCIMENTO DE <i>S. mutans</i> E <i>C. albicans</i> E ACIDOGENIA POR <i>S. mutans</i>	29
4.5.1 <i>Streptococcus mutans</i>	29
4.5.2 <i>Candida albicans</i>	31
4.6. AVALIAÇÃO DA ADESIVIDADE BACTERIANA DE <i>S. mutans</i> E <i>C. albicans</i> EM LAMÍNULAS DE VIDRO	32
4.7 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE INIBITÓRIA DO DERIVADO VEGETAL DE <i>Pelargonium graveolens</i> SOBRE AS CEPAS DE <i>S. mutans</i> E <i>C. albicans</i>	33
4.8 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM <i>P. graveolens</i> SOBRE A FORMAÇÃO DO TUBO GERMINATIVO EM <i>C. albicans</i>	34

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
5 RESULTADOS.....	35
5.1 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE GLICOSE DURANTE O CRESCIMENTO DE <i>S. mutans</i> E <i>C. albicans</i> E ACIDOGENIA POR <i>S. mutans</i>	35
5.1.1 Consumo de glicose e análise de pH em biofilme de <i>S. mutans</i>	35
5.1.2 Consumo de glicose por <i>C. albicans</i>	36
5.2 AVALIAÇÃO DA ADESIVIDADE BACTERIANA DE <i>S. mutans</i> E <i>C. albicans</i> EM LAMÍNULAS DE VIDRO	37
5.3 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE INIBITÓRIA DO DERIVADO VEGETAL DE <i>Pelargonium graveolens</i> SOB AS CEPAS DE <i>S. mutans</i> E <i>C. albicans</i>	38
5.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM <i>P. graveolens</i> SOBRE A FORMAÇÃO DO TUBO GERMINATIVO EM <i>C. albicans</i>	40
6 DISCUSSÃO	41
7 CONCLUSÕES	44
8 REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

A cavidade oral é constantemente exposta a uma ampla variedade de microrganismos, vírus, e outros agentes ambientais. Estas interações entre meio bucal e ambiente, provavelmente contribuem para o desencadeamento de muitas doenças, incluindo doenças infecciosas, autoimunes e até câncer (FOX, 2005). Entre as doenças bucais mais comuns, destaca-se a cárie. A cárie dental é considerada uma doença infectocontagiosa degenerativa, com etiologia multifatorial, que causa a destruição irreversível da estrutura mineralizada do dente, comprometendo a vitalidade e fixação dental no complexo maxilo-mandibular (MARSH, 2003). Nos últimos 30 anos o biofilme foi apontado como importante fator etiológico da cárie dentária. O biofilme pode causar alterações de maior ou menor intensidade, em função da susceptibilidade e informação genética de cada indivíduo. Embora a higienização bucal consiga desestruturar o biofilme, geralmente são utilizados agentes antimicrobianos em forma de enxaguatórios bucais que auxiliam os métodos mecânicos na remoção do biofilme e diminuem o número de microrganismos patogênicos da cavidade oral (MARINHO; ARAÚJO, 2007; YA-LING et. al., 2012).

Centenas de espécies de bactérias estão envolvidas no processo de formação da cárie dental, como por exemplo, estreptococos do grupo *mutans* e *Lactobacillus* spp. (BURNE et al., 2009). A literatura tem mostrado dados consistentes de que o grupo *mutans* de bactérias gram positivas, particularmente o *Streptococcus mutans*, são microrganismos sempre presentes no biofilme bucal e diretamente relacionados à cárie, sendo, portanto, seu controle de grande interesse na prevenção dessa doença (McNEILL; HAMILTON, 2003). A espécie *Streptococcus mutans* está fortemente associada à formação de biofilme e produção de ácidos como subproduto do metabolismo da fermentação de carboidratos (AAS, et al., 2008). A cárie dental é considerada um problema de saúde pública e muito se tem pesquisado no mundo inteiro na intenção de prevenir a ocorrência desse processo.

O biofilme dental é o fator de maior importância na etiologia da cárie e das doenças periodontais, e há uma relação muito grande com a higiene bucal deficiente (RAMAGE, et. al., 2005). No processo de formação do biofilme em tecidos moles há

ocorrência de candidíase, que é uma infecção de origem fúngica frequente no ambiente bucal e a principal espécie envolvida nessa patologia é *Candida albicans*, que tem como principal fator de virulência a capacidade de se aderir às células epiteliais da mucosa. Vários agentes antifúngicos são utilizados em seu tratamento, como também a clorexidina, mas devido aos efeitos colaterais decorrentes do uso prolongado, a sua utilização permanece restrita (ALVES, et. al., 2009).

Apesar de não substituir a escovação dentária, o uso de enxaguatórios bucais contendo substâncias ativas antimicrobianas tem sido proposto como um importante meio auxiliar de redução na formação de biofilme dental. Esses enxaguatórios são utilizados em várias situações clínicas para diferentes propósitos terapêuticos e profiláticos, muitos desses, recomendados para a prática de higienização diária (RUSSEL, 2004; YONEYAMA et al., 2006). A clorexidina tem sido considerada o padrão ouro em comparações com outros agentes químicos em Odontologia devido à sua capacidade de diminuir a formação do biofilme dental. Uma das principais vantagens de seu uso é o amplo espectro antimicrobiano, atuando tanto em microrganismos gram-positivos como em gram-negativos (CHARLES et al., 2004; ROSENTHAL et al., 2004). Inúmeros estudos demonstraram a eficácia do digluconato de clorexidina 0,12% na redução e formação do biofilme. Entretanto, o uso prolongado desta solução apresenta efeitos colaterais indesejáveis, como manchas nos dentes e na língua, perda do paladar e sensação de queimação na mucosa oral. Por isso, outras formulações têm sido estudadas na intenção de melhorar esses aspectos (SOUSA, 2007).

A utilização de produtos fitoterápicos tem se mostrado uma alternativa interessante em aplicações de várias áreas da saúde. Estes produtos naturais podem ser tão eficientes quanto os produzidos pela síntese química, contudo a transformação de uma planta em um medicamento deve visar à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a sua segurança de utilização, além de valorizar seu potencial terapêutico. Para atingir esses objetivos, a produção de fitoterápicos requer, necessariamente, estudos prévios relativos a aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, de desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas (HENGZHUANG, et al., 2013). Programas de fitoterapia estão sendo implantados em unidades básicas de saúde de vários estados

brasileiros com o intuito de contribuir com a assistência e a atenção primária à saúde, suprimindo carências medicamentosas nas comunidades, inclusive para tratamentos de patologias bucais (SANTOS et al., 2009; BORBA; MACEDO, 2006; SILVA et al., 2006).

Um grande número de plantas pertencentes ao gênero *Pelargonium* é conhecido por seus benefícios medicinais. A atividade antimicrobiana dos derivados vegetais dessas plantas e seus constituintes já foram descritos contra bactérias, fungos e patógenos, e também contra leveduras oportunistas (KOLODZIEJ, 2000; KOLODZIEJ; KAYSER; RADTKE, 2003; LATTE; KOLODZIEJ, 2000). O óleo essencial extraído da espécie *Pelargonium graveolens* já demonstrou atividade antimicrobiana contra *B. subtilis*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. neoformans*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium intracellulare* (GHANNADI et al., 2012). Altas concentrações de alguns compostos do extrato já foram relatadas como um eficiente inibidor do crescimento de microrganismos (DERWICH; BENZIANE; BOUKIR, 2010; GABRIELLA et al., 2010).

Considerando a potencial atividade antimicrobiana da espécie *Pelargonium graveolens*, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade metabólica dos biofilmes de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* após tratamento com derivados vegetais padronizados, visando à elaboração futura de formulações farmacêuticas para a utilização em enxaguatórios bucais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇAS BUCAIS

Doenças bucais continuam a ser um grave problema de saúde em todo o mundo (PETERSEN et al. 2005). Embora condições tais como câncer de boca e faringe, e lesões teciduais orais sejam grandes preocupações para a saúde oral, a cárie dentária e doenças periodontais são os mais importantes problemas globais de

saúde bucal (PETERSEN, 2003). A saúde bucal é parte integrante do bem-estar geral e relaciona-se com a qualidade de vida que se estende para além das funções do complexo craniofacial. Existe uma evidência considerável ligando má saúde bucal à condições crônicas, como uma forte associação entre doenças periodontais e doenças graves como a diabetes (PETERSEN et al. 2005; PETERSEN, 2005). Há também evidências que ligam má saúde bucal e doenças sistêmicas, tais como doenças cardiovasculares, artrite reumatóide e osteoporose, e também pode contribuir para o risco de complicações na gravidez, como parto prematuro de baixo peso ao nascer (RAUTEMAA et al. 2007; YEO et al. 2005).

A ligação entre doenças bucais e as atividades de espécies microbianas que fazem parte da microbiota da cavidade oral está bem estabelecida. Mais de 750 espécies de bactérias habitam a cavidade oral (~ 50% das quais ainda não foram indentificadas), e um certo número destas estão implicados em doenças bucais (JENKINSON & LAMONT, 2005).

2.2. CÁRIE E *Streptococcus mutans*

Apesar da implementação de medidas de controle e tratamento com flúor, a cárie permanece como a doença bucal mais prevalente em muitos países (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). A cárie é uma doença infecciosa multifatorial, causada pelo acúmulo de biofilme sobre a superfície do dente (MARSH, 2003). As manifestações da doença ocorrem quando há um desequilíbrio entre o biofilme e o hospedeiro devido à mudanças do pH na matriz do biofilme causadas pela dieta, microrganismos ou fluxo salivar e seus componentes (KAJFASZ et al., 2010).

Os dentes são colonizados por bactérias que existem no biofilme, cujo metabolismo ocasiona flutuações no pH. Este metabolismo é influenciado por fatores determinantes que por si só não levam ao desenvolvimento de cárie, mas modulam sua atividade. Entre estes, encontramos a composição do próprio biofilme, composição e capacidade tampão da saliva, velocidade da secreção salivar e composição e frequência da dieta (YA-LING; NASCIMENTO; BURNE, 2012). Além dos fatores determinantes, existem os fatores externos, que são aqueles que variam

de população para população nos quais se incluem os fatores socioeconômicos, educacionais e comportamentais (WEYNE; HARARI, 2002; PERINETTI et al., 2005).

Houve uma redução na prevalência da cárie dentária, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (MARTHALER, 2004). No entanto, a prevalência permanece alta entre as populações de baixo nível socioeconômico. Portanto, os indicadores socioeconômicos estão associados a fatores de risco para o desenvolvimento da cárie dentária (PETERSEN, 2005; VAN NIEUWENHUYSEN et al., 2002). Embora uma série de estudos epidemiológicos avaliaram as associações entre cárie dentária e indicadores socioeconômicos, nenhuma revisão sistemática da literatura oferece evidência científica comprovando tais associações (COSTA et al., 2012).

O biofilme é constituído de 70 a 80% por microrganismos e 30% por elementos não microbianos, como, por exemplo, polissacarídeos, mucina salivar, detritos alimentares, leucócitos, enzimas, sais minerais, proteínas e células epiteliais descamadas. A partir do momento que o biofilme foi considerado o fator causal principal da cárie e de doenças periodontais, é de suma importância o seu controle e prevenção para diminuir a incidência dessas doenças bucais (HORTENSE et al., 2010).

A resposta ao biofilme varia consideravelmente entre as pessoas e para prevenir o desenvolvimento da doença bucal, as medidas de higiene devem visar à inibição da formação do biofilme ou, quando não for possível, à redução da quantidade do biofilme formado em concentrações tais que não se desenvolva doença inflamatória destrutiva (HORST et al., 2012). *Streptococcus mutans* é considerado o mais cariogênico de todos os estreptococos identificados na cavidade bucal. A literatura tem mostrado dados consistentes de que o grupo *mutans* de bactérias gram positivas são microrganismos sempre presentes no biofilme bucal, sendo, portanto, de grande interesse na prevenção de doenças como a cárie (AJDIC, et al., 2002).

Estreptococos bucais podem entrar na corrente sanguínea através de ferimentos na cavidade oral e anexar à matriz fibrina-plaquetas, formadas no tecido endotelial lesado. A adesão de *S. mutans* no tecido cardíaco danificado é um evento importante na patogênese da endocardite infecciosa crônica (MILLER-TORBERT et al., 2008). *S. mutans* têm desenvolvido vários mecanismos distintos para sua

sobrevivência no interior da cavidade bucal (DMITRIEV et al., 2011). Os principais fatores de virulência incluem acidogenicidade e aciduricidade juntamente com a sua capacidade de produzir grandes quantidades de polissacarídeos extracelulares ou glucanos, que são sintetizados pelas enzimas glucosiltransferases (GTFs) a partir da ingestão de carboidratos na dieta. Já se sabe que *S. mutans* produz pelo menos três formas de GTFs: GTF B, GTF C e GTF D, sintetizando a maioria dos glucanos insolúveis, mistura de glucano solúvel e insolúvel, e glucano solúvel, respectivamente. Estes glucanos são essenciais para a formação estrutural e estabelecimento do biofilme (KOO et al., 2003). As glucosiltransferases são tidas como enzimas fundamentais para determinação da virulência do *S. mutans* na patogênese da cárie dental (MATTOS-GRANNER, et al., 2004).

A produção de ácidos por *S. mutans* e seu poder de tolerar o pH ácido, favorece sua sobrevivência contínua e colonização do biofilme (NASCIMENTO et al., 2004). Esses ácidos, assim, começam a dissociação do esmalte dos dentes, conseqüentemente, levando a descalcificação localizada, formação de cavidades e desagregação do tecido dental calcificado (HORST et al., 2012). Assim, uma abordagem importante para a prevenção da sua sobrevivência na cavidade oral (levando à cárie dentária), seria a inibição da GTFs. Este tem sido o objetivo de muitos estudos *in vitro*, onde diferentes agentes, incluindo derivados vegetais e outros produtos naturais, demonstraram ter estas características inibidoras (ISLAM, et al., 2008).

2.3 *Candida albicans*

A percepção clássica de microrganismos com formas de vida unicelular é quase inteiramente baseado no modo de cultura de crescimento, uma vez que as suspensões microbianas podem ser diluídas para uma única célula e estudada em meio de cultura. Este modo de crescimento tem tradicionalmente predominado no estudo da fisiologia e patogênese microbiana nos laboratórios de pesquisa. No entanto, muitos microrganismos em seus habitats naturais são encontrados em ecossistemas de biofilmes ligados a superfícies e não como organismos livres

flutuantes (planctônicos) (RAMAGE, et. al., 2005). Assim, os biofilmes são definidos como comunidades microbianas estruturadas, que são ligadas a uma superfície e envolta numa matriz de material exopolimérico. Isto é de especial significado, uma vez que é agora estimado que uma proporção significativa de todas as infecções microbianas humanas envolve a formação de biofilme (DOUGLAS, 2002).

O gênero *Candida* é composto por aproximadamente 200 espécies de leveduras com capacidades assimilatórias, oxidativas e fermentativas que permitem a utilização de várias e diferentes substâncias orgânicas para a nutrição. *Candida albicans* é um fungo que apresenta formas leveduriformes (blastoconídios) no estado saprófito, associadas à colonização assintomática; ou formas filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras), observadas em processos patogênicos. Dessa forma, o fungo tem a capacidade de se adaptar a diferentes nichos biológicos, podendo ser considerado a rigor, um organismo “pleomórfico” (KURTZMANN; FELL, 1998).

As leveduras do gênero *Candida* vivem normalmente nos mais diversos nichos corporais, como orofaringe, cavidade bucal, dobras da pele, secreções brônquicas, vagina, urina e fezes (BERMAN; SUDBERRY, 2002; SILVA et al., 2002; FERRAZZA et al., 2005). Os principais fatores de virulência para as espécies de *Candida* são a aderência, a hidrofobicidade da superfície celular, a produção do tubo germinativo, a produção de exoenzimas, o tigmotropismo e a mudança *switching* fenotípico (MCCULLOUGH et al., 1996; DE BERNARDIS et al., 2001).

A candidíase bucal é uma infecção causada pela levedura do gênero *Candida*, que é um microrganismo saprófito, que, na dependência de fatores predisponentes, torna-se patogênico (ALVES, et. al., 2009). Este fungo é oportunista e manifesta-se de forma infecciosa, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, atuando como marcador de doenças sistêmicas. Além disso, é comum em idosos, principalmente portadores de próteses e crianças na primeira infância (AKPAN; MORGAN, 2002). Os métodos químicos atuam como coadjuvantes no controle e prevenção da candidíase (CHIANG, et. al., 2007).

A formação de biofilmes por *Candida* traz repercussões clínicas importantes por causa de sua elevada resistência à terapia antifúngica e capacidade para suportar ao sistema imune do hospedeiro. Além disso, a formação de biofilme em dispositivos médicos e odontológicos pode, negativamente, impactar o hospedeiro,

servindo como um reservatório ou fonte para continuação de futuras infecções (SIQUEIRA; SEN, 2004).

Entre as espécies de *Candida*, a resistência aos antifúngicos tem sido um problema crescente, pois muitas das espécies mais comumente isoladas são menos susceptíveis aos derivados azólicos, o que dificulta o tratamento dos biofilmes e de outras infecções causadas por leveduras (TORTORANO, et al., 2006). Essa é uma das razões da crescente importância dos testes de susceptibilidade, visto que o conhecimento da sensibilidade aos agentes antifúngicos possibilita melhorar as condições de tratamento (ROGERS, 2006).

2.4 ENXAGUATÓRIOS BUCAIS

O uso de enxaguatórios bucais contendo substâncias ativas antimicrobianas em sua composição tem sido proposto como potencial auxiliar da higiene bucal diária por reduzir a formação do biofilme microbiano. Além do uso na Odontologia, as diversas substâncias ativas podem ser utilizadas em variadas concentrações e indicações, como lavagem das mãos, desinfecção de superfícies, desinfecção da via aérea superior, limpeza do cordão umbilical em recém-nascidos, limpeza de pequenos ferimentos e em unidades de terapia intensiva (FILGUEIRAS et. al., 2004; MULLANY et al., 2006; CHLEBICK; SAFDAR, 2007).

Muitos estudos demonstram que a combinação da composição de fluoreto de sódio e lauril de sódio sulfato, bem como óleos essenciais são capazes de diminuir a atividade metabólica dos microrganismos presentes no biofilme (PETERSEN; ASSEV; SCHEIE, 2006; TAKARADA, 2004). ZHANG et al., 2004, avaliaram o efeito de um enxaguatório bucal com e sem flúor sobre a atividade metabólica de biofilmes de *S. mutans* e demonstraram que enxaguatórios bucais contendo óleo essencial em sua composição, com ou sem 100 mg/kg de fluoreto reduz a atividade metabólica desses microrganismos e a consequente produção de ácidos em torno de 36% a 44%. Uma redução significativa no total de unidades formadoras de colônia (UFC) foi observada em saliva de voluntários saudáveis após um único bochecho com 0,2% (v/v) ou 0,12% (v/v) de clorexidina, mas apenas as

concentrações mais elevadas mostraram atividade bactericida contra bactérias anaeróbicas salivares obrigatórias (TOMÁS et al., 2008). Além disso, um estudo *in vivo* mostrou que tanto enxaguatórios bucais contendo óleo essencial quanto clorexidina livre de álcool foram capazes de reduzir a acidogenicidade da placa depois de um desafio com sacarose, sem diferença entre as duas soluções (ALBERTSSON et al., 2009).

Para um enxaguatório bucal ser considerado eficiente no controle químico do biofilme bacteriano, um agente antimicrobiano deve inibir o estágio de adesão da colonização bacteriana no biofilme, afetando o crescimento e a atividade metabólica dos microrganismos do biofilme sem, entretanto, a interferência em qualquer outro processo biológico. Além disso, a toxicidade deveria ser baixa, uma vez que tais soluções, ao serem utilizadas, podem ser eventualmente engolidas (GUIMARÃES et al., 2006).

Enxaguatórios bucais contendo clorexidina são considerados o padrão-ouro em comparações com outros agentes químicos em Odontologia devido à sua capacidade de evitar a formação do biofilme (CHARLES et al., 2004). Uma das principais vantagens de seu uso é o amplo espectro antimicrobiano, atuando tanto em microrganismos gram-positivos como em gram-negativos, além da substantividade prolongada e contínua, mesmo na presença de sangue e demais fluidos corporais (ROSENTHAL et al., 2004).

A clorexidina, por outro lado, é conhecida por causar, além de reações adversas, efeitos adversos diretamente relacionados com o aumento da concentração, tempo de uso e com o consumo de alguns agentes cromogênicos, tais como café ou chá, por exemplo, que podem aumentar a pigmentação dos dentes, que é um dos problemas mais reconhecidos relacionados à clorexidina (GUIMARÃES et al., 2006). Além disso, o sabor amargo da clorexidina e a redução temporária da percepção de alguns sabores poderiam comprometer a adesão ao tratamento com enxaguatórios bucais contendo esse composto (PRASANTH, 2011).

Recentemente, há um interesse mundial na chamada “medicina verde” e uma demanda crescente por mais drogas a partir de fontes vegetais. Assim, os produtos naturais continuam a ser uma fonte eficaz dos vários compostos bioativos, sem efeitos colaterais (KHAN, et al., 2009). O interesse por produtos naturais tem aumentado graças a descobertas de compostos bioativos eficazes no combate de

algumas patologias. Várias plantas têm sido estudadas como agentes antimicrobianos ativos, de efeitos satisfatórios e baixo custo experimental. A eficácia de plantas, empregadas em enxaguatórios bucais, tem sido investigada para o tratamento de várias doenças, sobretudo em relação à saúde bucal, e os resultados sugerem que os princípios ativos das plantas possam ser utilizados como apoio à terapia e como profilaxia de rotina (CORDEIRO et al., 2006).

2.5 FITOTERAPIA NA SAÚDE PÚBLICA

Cada vez mais se têm voltado os olhos à busca das plantas medicinais e/ou seus derivados como agentes terapêuticos naturais com o intuito de promover a manutenção da saúde primária e, conseqüentemente, melhorar a qualidade de vida. O estímulo ao uso destes fitoterápicos tem como objetivo: prevenir, curar ou minimizar os sintomas das doenças, com um custo mais acessível à população e aos serviços públicos de saúde, comparativamente àqueles obtidos por síntese química, que são, em geral, mais caros, devido às patentes tecnológicas envolvidas (TOLETO et al., 2003).

Plantas medicinais produzem diferentes substâncias químicas (alcalóides, taninos, flavonóides, saponinas, entre outros) e o fazem em diferentes proporções, dependendo do habitat, da pluviosidade, do oferecimento de luz às plantas, das características dos solos, enfim, das características climáticas e ambientais de seu habitat, além do seu potencial genético. Algumas substâncias químicas são características de uma determinada espécie vegetal, servindo como parâmetros para a sua caracterização e identificação (MIGLIATO et al., 2007; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

O desenvolvimento de fitoterápicos inclui várias etapas e envolve um processo multidisciplinar. As áreas de conhecimento envolvidas vão desde a antropologia botânica, botânica, agronomia, ecologia, química, fitoquímica, farmacologia, toxicologia, biotecnologia, química orgânica até a tecnologia farmacêutica. A avaliação da atividade biológica inclui a investigação da atividade farmacológica e toxicológica de substâncias isoladas, frações obtidas ou derivados

vegetais brutos da droga vegetal. Esses aspectos são fundamentais para a transformação de uma planta medicinal em medicamento fitoterápico, havendo a necessidade de estudos de desenvolvimento tecnológico, no qual a validação do processo tecnológico exige a conservação da composição química e, sobretudo, da atividade farmacológica a ser explorada. Os métodos analíticos permitem a avaliação da qualidade do produto fitoterápico, garantindo, assim, a constância de ação terapêutica e a segurança de utilização (TOLEDO et al., 2003; SONAGLIO et al., 2007).

Desde 1886, a biodiversidade e o potencial econômico da flora brasileira vêm sendo descritos em inventários, testemunhando a sua riqueza em plantas produtoras de frutos alimentares, resinas, óleos, gomas, aromas, e, principalmente, o potencial medicinal, podendo citar muitas espécies (JACOBSON et al., 2005).

O Brasil tem conhecimento científico sobre um percentual, ainda que baixo, das plantas destinadas ao uso medicinal e as empresas brasileiras têm capacitação necessária para gerar processos tecnológicos, no entanto não possuem um corpo de pesquisa e desenvolvimento capaz de gerar inovações na área de fitomedicamentos de forma contínua. Com o uso sustentável da biodiversidade nacional, e um desenvolvimento de parcerias das Universidades com as empresas, alguns desafios poderão ser suplantados para gerar novos fitomedicamentos éticos para o Brasil (KLEIN, et al., 2009).

O interesse em enxaguatórios bucais e pastas de dente à base de derivados vegetais de plantas tem aumentado recentemente. Entre estes produtos à base de plantas, o Parodontax tem recebido grande atenção. Este produto, que está no mercado, é composto por bicarbonato de sódio, fluoreto de sódio (1,400 ppm) e ingredientes à base de plantas: camomila, que é suposto ter propriedades anti-inflamatórias, o que diminui a inflamação gengival; equinácea, que é conhecida como um potente estimulador da resposta imune; sálvia e ratânia, que têm propriedades anti-hemorrágicas; mirra, conhecida por ser um anti-séptico natural, e óleo de hortelã-pimenta, que possui propriedades analgésicas, anti-sépticas e anti-inflamatórias (OZAKI et al., 2006).

2.6 *Pelargonium graveolens*

Conhecida como gerânio ou malva-cheirosa, a espécie *Pelargonium graveolens* (Geraniaceae) é uma planta aromática, originária da África do Sul (SIMON et al., 1984). O aroma doce e quente, semelhante ao de pétalas de rosas é comercialmente conhecido como óleo de gerânio e amplamente usado em sabonetes e nas indústrias de perfumaria e cosméticos, sendo também utilizado como terapêutico (aromaterapia) para combater problemas da menopausa, de pele, tensão nervosa e ansiedade (SAXENA et al., 2000; RAO, 2002).

Óleos essenciais extraídos de plantas são importantes por sua comprovada atividade antimicrobiana (SIMÕES, 2011; BOTELHO et al., 2007), incluindo a já comprovada ação contra o *S. mutans*, a cepa de estreptococos tida como mais cariogênica (SILVA, 2005). Eles são compostos complexos voláteis, naturais, formados como metabólitos secundários por plantas aromáticas. Eles são conhecidos por sua atividade bactericida, virucida, fungicida, sendo amplamente utilizados como sedativos, anti-inflamatórios, analgésicos, espasmolíticos e por suas propriedades anestésicas. A presença de complexas estruturas químicas constituídas por vários grupos, tais como os terpenos e terpenóides, constituintes aromáticos e alifáticos, todos caracterizados pelo baixo peso molecular, podem explicar a eficiência de suas ações bacteriostáticas e bactericidas (BAKKALI et al., 2008). Os principais componentes presentes no óleo essencial das folhas frescas de gerânio obtidos por hidrodestilação são: citronelol, geraniol, linalol e formiato de citronelila (NICULAU, 2011).

Historicamente, o óleo essencial de gerânio tem sido utilizado no tratamento de disenteria, hemorróidas, inflamação, para regular fluxos menstruais abundantes e até mesmo câncer (ANG et al., 2010). A comunidade medicinal francesa atualmente utiliza o óleo para tratar diabetes, diarreia, problemas de vesícula, úlceras gástricas, problemas de fígado, esterilidade e cálculos urinário (ELMANN et. al., 2010). Apesar de alguns estudos terem demonstrado que derivados vegetais de *P. graveolens* contêm ações antimicrobianas, ainda há muito o que ser estudado para comprovar sua eficiência sobre microrganismos como *S. mutans* e *C. albicans*, especialmente utilizando-se derivados vegetais aquosos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana, antiaderente e antiacidúrica em cepas padrão de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e de *Candida albicans* (CEC 1291) pelos derivados vegetais padronizados de *Pelargonium graveolens* visando à elaboração futura de formulações farmacêuticas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar testes de disco difusão utilizando clorexidina como controle positivo, e derivados vegetais de *Pelargonium graveolens* sobre os microrganismos *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*.
- Realizar testes para avaliar o consumo de glicose sobre os microrganismos *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* após tratamento com derivado vegetal de *Pelargonium graveolens* e clorexidina como controle positivo.
- Realizar testes para avaliar a produção de ácidos pelo microrganismo *Streptococcus mutans* após tratamento com derivado vegetal de *Pelargonium graveolens* e clorexidina como controle positivo.
- Realizar testes para avaliar aderência das células de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* em lamínulas após tratamento com derivado vegetal de *Pelargonium graveolens*.
- Realizar testes para avaliar se houve a formação do tubo germinativo da *Candida albicans* quando tratado com derivado vegetal de *Pelargonium graveolens*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTIVO, MANUTENÇÃO E COLETA DAS PLANTAS MEDICINAIS

O Cultivo de *Pelargonium graveolens* foi realizado no canteiro de plantas medicinais da Universidade de Uberaba – UNIUBE Campus Aeroporto, com dispersão de água uma vez por dia. As folhas foram coletadas manualmente de acordo com a seleção quanto à integridade, idade adulta, sendo coletada no máximo 20% folha por planta.

4.2 IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DO VEGETAL

As amostras de *Pelargonium graveolens* cultivadas foram coletadas com ramos, folhas, e flores (Figura 1) e então as exsiccatas foram preparadas por prensagem e secagem a 40°. As exsiccatas foram então encaminhadas para herbário credenciado para confirmação do nome científico.



Figura 1: Amostras de *Pelargonium graveolens* utilizadas neste trabalho.

4.3 PREPARO DAS PLANTAS MEDICINAIS PARA ESTUDO

Após a coleta, as folhas adultas de *Pelargonium graveolens* passaram por nova seleção. As plantas foram coletadas manualmente no dia 01/10/13 às 09 horas e 38 minutos, no canteiro do laboratório do Bloco D de acordo com a seleção quanto à integridade, idade adulta, sendo coletada no máximo 20% das folhas da planta. Foram selecionadas as folhas mais verdes e mais novas com um padrão de cor e com metade da extensão do caule. Lavou-se a planta com água corrente e, em seguida, água ultra pura. A planta foi pesada (105g, folhas umedecidas com o processo de lavagem), as folhas foram cortadas com tesoura e maceradas. As folhas maceradas foram então transferidas para um béquer em chapa de aquecimento a 80°C contendo 600 ml de água ultra pura. Após a adição das folhas, a temperatura do volume no béquer caiu para 50°C, assim que a temperatura voltou a 80°C, a solução foi mantida na chapa por 20 minutos. O rendimento final da extração foi de 200 ml. O extrato foi filtrado três vezes seguidas em filtro duplo qualitativo de 80g e 15 cm de diâmetro, em bomba a vácuo. Depois, em capela de fluxo laminar o extrato foi filtrado em filtro estéril de 0,22 µm e várias amostras foram congeladas em tubos separados. Os derivados vegetais foram obtidos pelo método de infusão e então submetidos aos testes *in vitro*, propostos neste projeto.

4.4 PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DE *Streptococcus mutans* E *Candida albicans* EM MEIO LÍQUIDO

A cepa ATCC 25175 de *Streptococcus mutans*, foi adquirida da Fundação André Tosello, armazenada (- 20°C) em uma solução contendo 40% (v/v) de glicerol e sua pureza checada antes do uso através de um inóculo em meio de crescimento. Para cultivar e avaliar a pureza da bactéria foram utilizados os meios de cultivo TSB ou TSA, os quais foram preparados de acordo com as instruções do próprio fabricante. Para os demais testes de crescimento bacteriano na presença de diferentes fontes de carbono, foi empregado o meio completo conforme protocolo já

descrito (DHASPER & REYNOLDS, 1991). Todos os materiais, carboidratos e meios de cultivo, foram autoclavados a 121°C durante 20 minutos, antes do uso. Os cultivos foram efetuados em 5 ml de meio líquido TSB por 12 horas a 37°C em atmosfera de ar 20% CO₂, a fim de produzir um ambiente favorável ao crescimento do microrganismo. Um volume de 100 µL do pré inóculo de *S. mutans* foram utilizados para infectar 10 ml de meio TSB, seguido por incubação a 37°C por 12 h em atmosfera de ar 20% CO₂. Após a Incubação, a turbidez inicial das bactérias foi avaliada em um espectrofotômetro e ajustada inicialmente para $A_{600nm} = 0,5$.

A cepa de *Candida albicans* CEC 1291 foi cedida para o desenvolvimento do projeto pelo professor Christophe d'Enfert do Unité Biologie et Pathogenicité Fongiques do instituto Pasteur-França. A mesma se encontra no laboratório, aliquotada em tubos criogênicos e congelada em nitrogênio líquido a -120°C. Um volume de 50 µL do estoque de *C. albicans* foi semeado em Agar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, MI, USA) e incubada a 37°C por 48h. Após a Incubação, colônias foram transferidas para um meio líquido de cultivo de Brain Heart Infusion (BHI) por 16 h. Após o cultivo de BHI, a padronização da turbidez foi realizada utilizando 10⁶ UFC/ml de *C. albicans* através por espectrofotômetro a 530nm, ajustando a absorbância $A_{530} = 0,680$ antes dos experimentos.

4.5 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE GLICOSE DURANTE O CRESCIMENTO DE *S. mutans* E *C. albicans* E ACIDOGENIA POR *S. mutans*

4.5.1 *Streptococcus mutans*

Para avaliação do consumo de glicose presente no meio de cultivo pelo *S. mutans*, um volume de 1 ml de meio TSB suplementado com 50 mmol de sacarose (2M/L) foi adicionado a 6 poços de uma placa, seguido da inoculação de 50 µL da bactéria (10⁶ UFC/ml), seguido por 12 horas de incubação a 37°C em estufa contendo 20% CO₂. Os poços foram lavados 3 vezes com solução PBS (Phosphate Buffered Saline) estéril e divididos em 6 grupos (A-F) para análise do pH:

Grupos	Composição do grupo
A	950 µL de BHI e 50 µL de Clorexidina (Periogard® s/ Álcool)
B	900 µL de TSB (ausência de sacarose) e 100 µL de PBS
C	990 µL de TSB (ausência de sacarose) e 10 µL do DV de <i>Pelargonium graveolens</i>
D	950 µL de TSB (ausência de sacarose) e 50 µL do DV de <i>Pelargonium graveolens</i>
E	900 µL de TSB (ausência de sacarose) e 100 µL do DV de <i>Pelargonium graveolens</i>
F	900 µL de TSB (ausência de sacarose) e 100 µL de água

As medidas de pH foram realizadas para cada grupo após a incubação de 1, 2, 3, 4 horas a 37°C em atmosfera de ar 20% CO₂. Após este tempo, um volume de 100 µL foi coletado de cada grupo analisado e congelado a -20°C e submetidas para análise bioquímica do consumo de glicose.

Para as análises do consumo de glicose, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente no momento do ensaio e centrifugadas (Microcentrifuga NT 805, Nova Técnica) (3000 RPM durante 10 minutos). A avaliação quantitativa da glicose foi realizada no meio de cultivo durante diferentes fases (60, 120, 180, 240 minutos) do crescimento da bactéria *S. mutans* por método enzimático (Kit Biotechnica ref.1000800) em um espectrofotômetro (T60UV Spectrofotometer) à 505_{nm}.

4.5.2 *Candida albicans*

Para a formação do biofilme de *C. albicans*, um volume de 1 ml de meio BHI suplementado com 1.5% de glicose foi adicionado à placa, seguido da inoculação de 50µL da bactéria (10^6 UFC/ml) por poço. Um volume de 250µL de uma solução contendo soro bovino fetal (SBF) foi adicionado por poço da placa, seguido por 12 horas de incubação a 37°C em estufa, previamente a preparação da suspensão. Os poços foram lavados 3 vezes com solução PBS (Phosphate Buffered Saline) estéril e divididos em 6 grupos (A-F) para análise do consumo de glicose:

Grupo	Composição do grupo
A	950 µL de BHI e 50 µL de Clorexidina (Periogard® s/ Álcool)
B	900 µL de BHI e 100 µL de PBS
C	990 µL de BHI e 10 µL do DV de <i>Pelargonium graveolens</i>
D	950 µL de BHI e 50 µL do DV de <i>Pelargonium graveolens</i>
E	900 µL de BHI e 100 µL do DV de <i>Pelargonium graveolens</i>
F	900 µL de BHI e 100 µL de água

A placa foi incubada por 1, 2, 3, 4 horas a 37°C em estufa. Após este tempo, um volume de 100 µL foi coletado de cada grupo analisado e congelado a -20°C e submetidas para análise bioquímica do consumo de glicose.

Para as análises do consumo de glicose, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente no momento do ensaio e centrifugadas (Microcentrifuga NT 805, Nova Técnica) (3000 RPM durante 10 minutos). A avaliação quantitativa da glicose foi realizada no meio de cultivo durante diferentes fases (60, 120, 180, 240 minutos) do crescimento da *C. albicans* por método enzimático (Kit Biotecnica ref.1000800) em um espectrofotômetro (T60UV Spectrofotometer) à 505_{nm}.

4.6. AVALIAÇÃO DA ADESIVIDADE BACTERIANA DE *S. mutans* E *C. albicans* EM LAMÍNULAS DE VIDRO

Para promover o crescimento do biofilme de *S. mutans*, o meio completo, descrito por Dhasper e Reynolds (1991), foi previamente autoclavado e utilizado nos experimentos com o biofilme. Solução estoque com clorexidina 150 µL (controle positivo), assim como as soluções estoque de *Pelargonium graveolens*, previamente autoclavadas e/ou filtradas em filtro estéril de 0,22 µm, foram incorporadas individualmente ao meio de cultivo completo para, posteriormente, procedermos com o cultivo do *S. mutans*. A estes meios de cultivos (suplementados com o derivado vegetal ou com antimicrobianos) foram incorporadas lamínulas circulares de vidro (borossilicato) onde ocorreu a formação de um biofilme bacteriano, conforme descrito por Paulino e colaboradores (2005). A turbidez das células utilizadas como pré-inóculo para o experimento foi ajustada para $A_{600nm} = 0,5$. Para a formação do biofilme, 2850 ml de meio TSB foi suplementado com 50 mmol de sacarose (2M/L), seguido da inoculação de 100 µL da bactéria (10^6 UFC/ml) e 150 µL de derivado vegetal *P. graveolens*. Como controle positivo, no lugar do DV colocou 150 µL de clorexidina e, como controle negativo 150 µL de PBS. Incubamos por 1 hora com agitação vigorosa por 1 minuto a cada 10 minutos. Transferiu 1 ml dessa suspensão para a placa de polietileno com a lamínula de vidro e incubamos a 37° C durante 1,2 e 3 horas em atmosfera de ar 20% CO₂. Após este período, o meio de crescimento foi removido e cada lamínula foi lavada com PBS (NaCl 0,13 mol/L, KCl 2,7 mmol/L, Na₂HPO₄ 8,1 mol/L e KH₂PO₄ 1,47 mol/L pH final de 7,5), seca a temperatura ambiente, corada com uma gota de Cristal Violeta e as imagens foram capturadas através de Microscópio (Ziess Scope. A1, Câmera AxioCam Cc1).

Para a formação do biofilme de *C. albicans*, lamínulas circulares foram pré-tratadas com 100 µL Soro-Fetal Bovino (SFB) por 24 horas. Após este tratamento, o SFB foi removido e o meio de cultivo contendo *C. albicans* foi adicionado a cada poço (1 mL) da suspensão. A suspensão foi preparada com 2850 ml de meio TSB suplementado com 1.5% de glicose, seguido da inoculação de 100 µL da bactéria (10^6 UFC/ml) e 150 µL de derivado vegetal *P. graveolens*. Como controle positivo, colocou-se 150 µL de clorexidina e como controle negativo 150 µL de PBS.

Incubamos por 1 hora com agitação vigorosa por 1 minuto a cada 10 minutos. A placa foi incubada a 37° C e após 1, 2 e 3 horas, as lamínulas foram lavadas com PBS (NaCl 0,13 mol/L, KCl 2,7 mmol/L, Na₂HPO₄ 8,1 mol/L e KH₂PO₄ 1,47 mol/L pH final de 7,5), seca a temperatura ambiente, corada com uma gota de Cristal Violeta e as imagens foram capturadas através de um Microscópio (Ziess Scope . A1, Câmera AxioCam Cc1).

4.7 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE INIBITÓRIA DO EXTRATO DE *Pelargonium graveolens* SOBRE AS CEPAS DE *S. mutans* E *C. albicans*

A metodologia utilizando disco de difusão em meio TSA empregada neste trabalho foi a mesma descrita por BAUER et. al. (1966), com algumas modificações. Discos de papel qualitativo de 6 mm de diâmetro foram identificados numericamente e 5µL de tween-20 1% foi adicionado sobre os mesmos para impregnação dos discos. Os discos de papel foram autoclavados a 121°C por 20 min e as soluções listadas a seguir foram filtradas em filtro estéril de 0,22 µm e incorporadas aos discos, que foram identificados da seguinte maneira:

- Disco 1: apenas disco vazio, sem tratamento (controle negativo)
- Disco 2: 2µL Dv de *Pelargonium graveolens*
- Disco 3: 4µLTween 0.1% (controle do tween)
- Disco 4: 4µL clorexidina (controle positivo)
- Disco 5: 4µL DV de *Pelargonium graveolens*
- Disco 6: 8µL DV de *Pelargonium graveolens*
- Disco 7: 16µL DV de *Pelargonium graveolens*
- Disco 8: 32µL DV de *Pelargonium graveolens*

Depois de tratados como mencionado à cima, os discos foram colocados sobre as placas onde foi realizado o teste de inibição de crescimento (determinação do halo de inibição) das cepas de *S. mutans* e *C. albicans*. Todos os cultivos ocorreram numa estufa com 20% CO₂ a 37°C durante 24 horas. Após o cultivo, os halos de inibição formados foram medidos por paquímetro e uma média a partir de triplicatas foi determinada.

4.8 AVALIAÇÕES DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM *P. graveolens* SOBRE A FORMAÇÃO DO TUBO GERMINATIVO EM *C. albicans*

Colônias de *C. albicans* foram cultivadas em meio líquido BHI a fim de se obter uma concentração de 10⁶ UFC/ml ajustando a absorbância em um espectrofotômetro à $A_{530\text{ nm}} = 0,680$ OD, antes dos experimentos. Um volume de 100 µL de SFB contendo 100 µL do derivado vegetal de *Pelargonium graveolens* foi adicionado em uma placa de 96 poços. Em seguida foram adicionados à solução, 100 µL da suspensão de leveduras. O antimicótico fluconazol foi utilizado como controle positivo e uma solução tampão, o PBS como controle negativo.

A placa de 96 poços foi então incubada a 37°C por 3 horas, então uma alíquota de 20 µL foi retirada e colocada em uma lamínula de microscópio para análise do efeito do derivado vegetal sobre a formação do tubo germinativo.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados em triplicata de valores provenientes de três ensaios independentes e os resultados refletem a média destes valores. A análise T-student foi utilizada para avaliar a significância entre os grupos experimentais avaliados.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÕES DO CONSUMO DE GLICOSE DURANTE O CRESCIMENTO DE *S. mutans* E *C. albicans* E ACIDOGENIA POR *S. mutans*

5.1.1 Consumo de glicose e análise de pH em biofilme de *S. mutans*

A capacidade acidogênica do biofilme de *S. mutans* não apresentou resultado significativo quando comparada com o controle positivo utilizando clorexidina, visto que houve uma diminuição do pH em todas as concentrações analisadas, mostrando assim que não houve redução da viabilidade celular do biofilme, como observado na Figura 2.

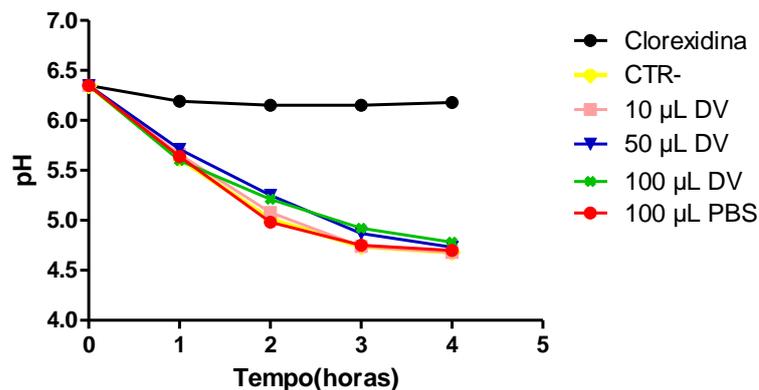


Figura 2. Variação de pH em meio TSB com biofilme de *S. mutans* ao longo de 4 horas de experimento. Os grupos experimentais, quando comparados com o grupo CTR- apresentaram os seguintes valores de p: Clorexidina ($p=0,0218$); 10 µL DV ($p=0,4809$); 50 µL DV ($p=0,4097$); 100 µL DV ($p=0,4166$); 100 µL PBS ($p=0,4965$). A análise estatística foi realizada comparativamente entre os grupos

O consumo de glicose apresentou resultados similares à análise de pH, frente à viabilidade celular do biofilme. Todas as concentrações dos derivados de *P. graveolens* analisados, não apresentaram efeito antimicrobiano sobre biofilme de *S. mutans*, quando comparadas com o controle positivo (clorexidina), como observado na Figura 3. A este fato deve-se a atividade metabólica da célula em realizar a

metabolização dos açúcares do meio e liberar ácidos orgânicos, acidificando o meio em questão. Não houve diferenças significativas entre os grupos tratados com diferentes volumes do DV e o grupo CTR -.

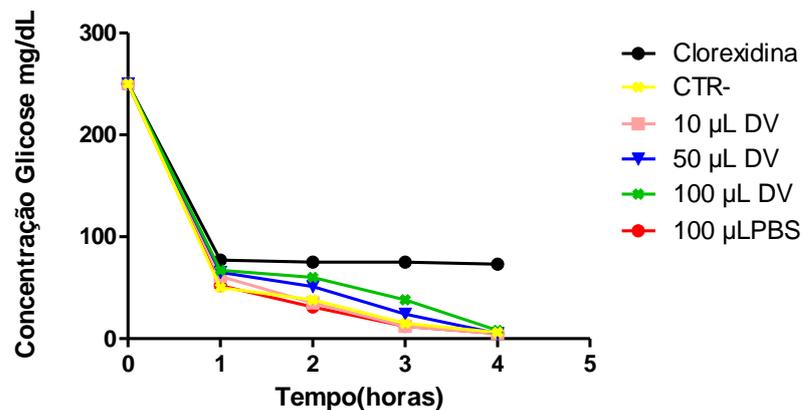


Figura 3. Consumo de glicose pelo biofilme de *S. mutans* ao longo de 4 horas de experimento. Os grupos experimentais, quando comparados com o grupo CTR- apresentaram os seguintes valores de p: Clorexidina ($p=0,2535$); 10 µL DV ($p=0,4844$); 50 µL DV ($p=0,4454$); 100 µL DV ($p=0,4106$); 100 µL PBS ($p=0,4892$). A análise estatística foi realizada comparativamente entre os grupos

5.1.2 Consumo de glicose por *C. albicans*

O consumo de carboidratos pelo biofilme de *C. albicans* não apresentou resultados positivos quanto à ação do derivado vegetal de *Pelargonium graveolens*. O consumo de glicose das concentrações testadas parece apresentar eficácia com 100 µL de derivado vegetal, pois há o consumo de glicose na primeira hora, ocorrendo à estabilidade da concentração até o término da quarta hora, quando comparado com as concentrações de 10 e 50 µL e com o controle positivo (clorexidina), como observado na Figura 4. Não houve diferenças significativas entre os grupos tratados com diferentes volumes do DV e o grupo CTR -.

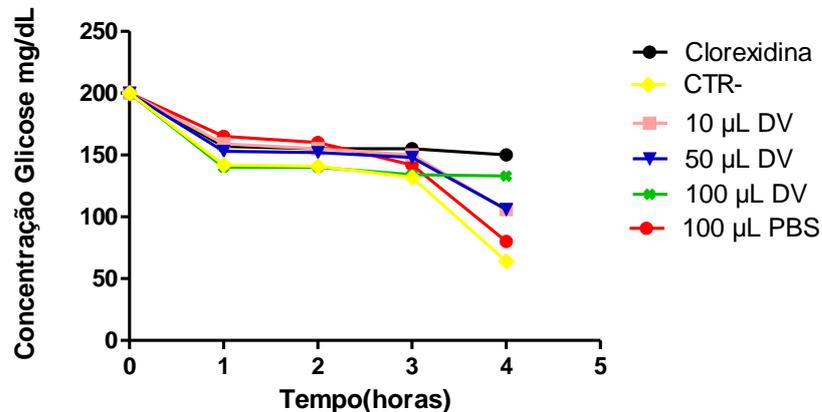


Figura 4. Consumo de glicose pelo biofilme de *C. albicans* ao longo de 4 horas de experimento. Os grupos experimentais, quando comparados com o grupo CTR- apresentaram os seguintes valores de p: Clorexidina ($p=0,2692$); 10 µL DV ($p=0,4286$); 50 µL DV ($p=0,4625$); 100 µL DV ($p=0,5000$); 100 µL PBS ($p=0,3273$). A análise estatística foi realizada comparativamente entre os grupos.

5.2 AVALIAÇÕES DA ADESIVIDADE BACTERIANA DE *S. mutans* E *C. albicans* EM LAMÍNULAS DE VIDRO

Para avaliar a capacidade de aderência das células de *S. mutans* e *C. albicans*, o meio de cultivo foi tratado com o derivado vegetal de *P. graveolens*, clorexidina, como controle positivo e solução tampão, como controle negativo. Após a formação do biofilme em lamínulas circulares de vidro em tempos de incubação diferentes, temos as imagens observadas em microscópio. Comparando o derivado vegetal, Malva, com os controles positivo (clorexidina) e negativo (PBS) houve uma diminuição do número de células. O derivado vegetal parece inibir a formação do biofilme no volume utilizado, tanto para as células de *S. mutans* e de *C. albicans*, como apresentado na figura 5A e figura 5B.

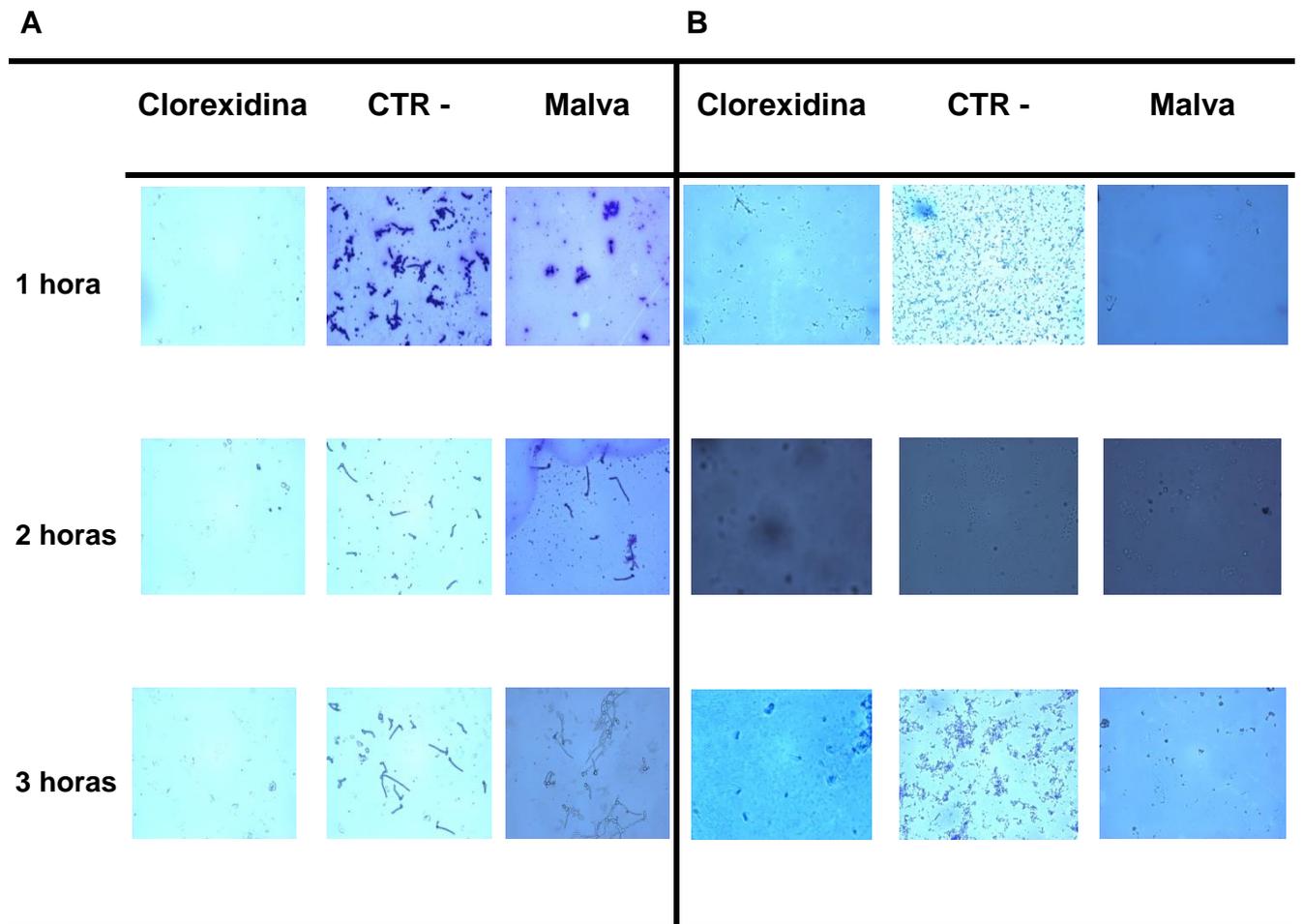


Figura 5A. Avaliação qualitativa da formação do biofilme de *C. albicans*.

Figura 5B. Avaliação qualitativa da formação do biofilme de *S. mutans*.

5.3 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE INIBITÓRIA DO EXTRATO DE *Pelargonium graveolens* SOB AS CEPAS DE *S. mutans* E *C. albicans*

Na Tabela 1, pode-se observar as medidas de halo encontradas em centímetros (cm) que representam as fotos apresentadas na Figura 6.

Tabela 1: Medidas (cm) do halo de inibição frente às cepas de *C. albicans* e *S. mutans*. Valores expressos como média de triplicata experimental.

	<i>C. albicans</i>			<i>S. mutans</i>		
Grupo 1¹	0	0	0	0	0	0
Grupo 2²	0	0	0	0	0	0
Grupo 3³	0	0	0	0	0	0
Grupo 4⁴	1,0	1,15	1,2	2,3	2,1	2,1
Grupo 5⁵	0	0	0	0,6	0,75	0,7
Grupo 6⁶	0	0	0,7	0,8	0,85	0,8
Grupo 7⁷	0,7	0,75	1,0	0,95	1,0	0,9
Grupo 8⁸	0.95	0.9	1.2	1.1	1.1	0.95

¹Controle negativo; ²2µL DV *P. graveolens*, ³Tween 0.1%; ⁴Clorexidina; ^{5,6,7,8}Diferentes concentrações do DV de *P. graveolens*.

O grupo 1 (controle negativo) e o grupo 3 (tween 0.1%) não apresentaram nenhuma ação inibidora dos microrganismos testados. Como já era esperado, o grupo 4 (clorexidina), tido como controle positivo, apresentou atividades inibitórias com halo médio de 1,11 sob *C. albicans* e 2,16 sob *S. mutans*. Quando a capacidade inibitória do derivado vegetal de *P. graveolens* foi testada, não foi observado halo de inibição no grupo 2 (2µL-DV) para os dois microrganismos analisados. O grupo 5 (4µL-DV) não foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* mas demonstrou atividade contra *S. mutans* com halo médio de 0,68. O grupo 6 (8µL-DV) foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* em apenas uma amostra da triplicata apresentando halo de 0,7, porém quando testado com *S. mutans* todas as amostras da triplicata apresentaram atividade inibitória, com halo médio de 0,816.

O grupo 7 demonstrou atividade inibitória com halo médio de 0,816 sob *C. albicans* e 0,95 sob *S. mutans*. O grupo 8 demonstrou atividade inibitória com halo médio de 1,01 sob *C. albicans* e 1,05 sob *S. mutans*.

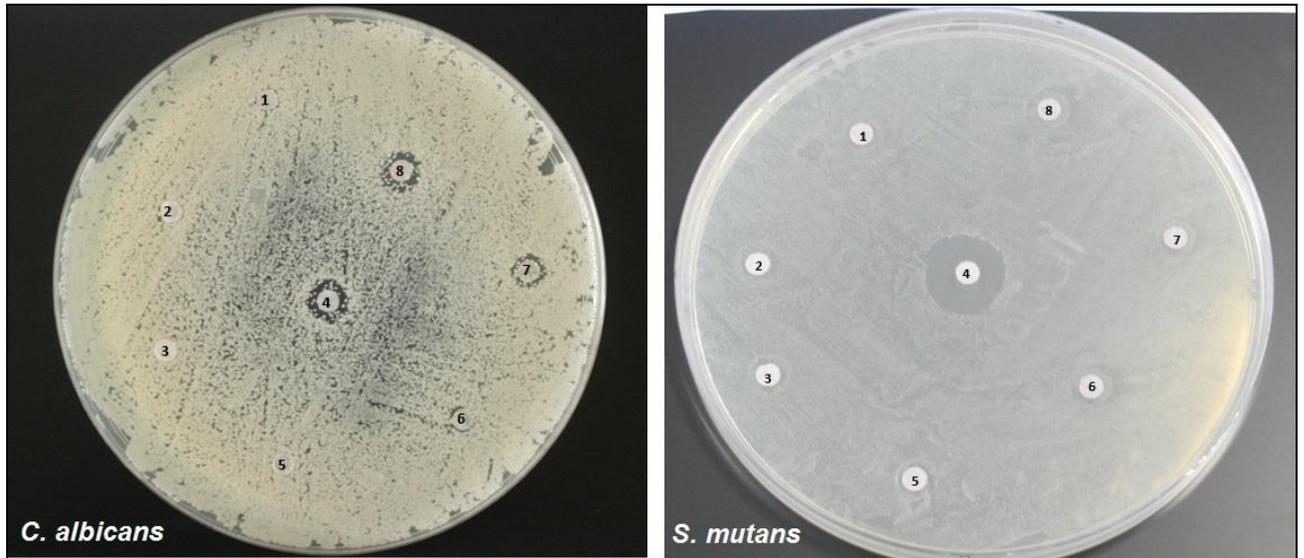


Figura 6: Análise dos halos de inibição das cepas de *C. albicans* e *S. mutans*.

5.4 AVALIAÇÕES DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM *P. graveolens* SOBRE A FORMAÇÃO DO TUBO GERMINATIVO EM *C. albicans*

O efeito do derivado vegetal de *Pelargonium graveolens* sobre a formação do tubo germinativo de *C. albicans* foi analisado utilizando uma suspensão da levedura em SBF previamente tratadas com derivado vegetal de *Pelargonium graveolens*.

Após incubação adequada, as células tratadas com derivado vegetal de malva, PBS (controle negativo) e fluconazol (controle positivo), foram microscopicamente analisadas, apresentando uma redução no número de células por campo, porém não apresentando inibição do tubo germinativo, como apresentado na figura 7.

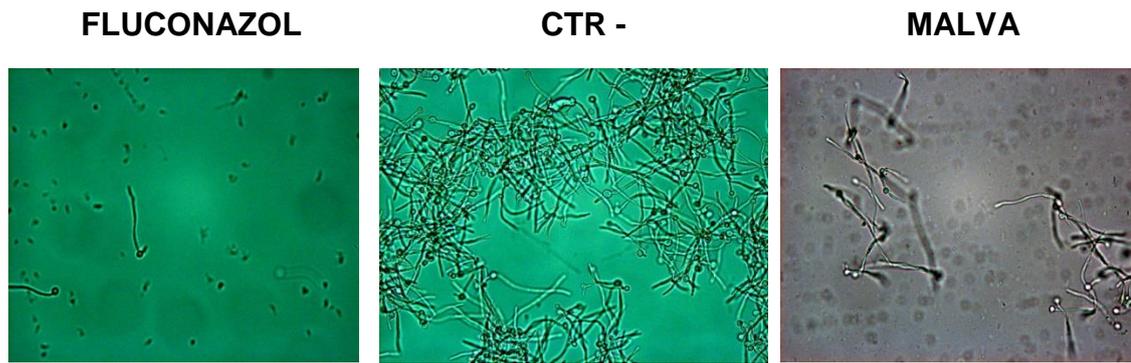


Figura 7. Avaliação qualitativa do ensaio para avaliação de formação do tubo germinativo em *C. albicans*.

6 DISCUSSÃO

Conforme observado nos resultados do consumo de glicose e análise do pH do *S. mutans*, quando comparados os grupos experimentais com o grupo CTR- percebeu-se que o consumo de glicose e os valores de pH sofreram alterações semelhantes, indicando a não efetividade esperada do derivado vegetal. Assim, pode-se afirmar que, nas condições experimentadas, o derivado vegetal de *P. graveolens*, em nenhuma das concentrações analisadas, foi capaz de interferir no metabolismo bioenergético destas células. Especulativamente pode-se dizer que a via glicolítica destas células (*S. mutans* e/ou *C. albicans*) não sofreu alterações perceptíveis com as análises realizadas (pHmetria e consumo de glicose), pois não foram detectadas alterações expressivas nos valores de pH, assim como no consumo da glicose (comparando-se com o grupo CTR-). Sabe-se também que o consumo de carboidratos normalmente tem como reflexo em bactérias acidogênicas, o decaimento do pH, fato este que não ocorrera. Assim, como não houve diferenças significativas entre os grupos tratados com os diferentes volumes do derivado vegetal e o grupo CTR-. É fato que o derivado vegetal de *P. graveolens* não interfere no metabolismo bioenergético da bactéria *S. mutans* (especialmente sobre a via glicolítica) (NELSON; COX, 2011).

A avaliação do consumo de glicose para a levedura, *C. albicans*, também não demonstrou diferenças significativas entre os grupos tratados com diferentes volumes do derivado vegetal de *P. graveolens*. A *C. albicans* por não ser acidogênica, não se observa um decaimento do pH. Interessantemente, estas células apresentaram o mesmo perfil de consumo de glicose quando se comparou os grupos experimentais com o grupo CTR-, o que indica que trata-se de uma célula que utilizou a glicose como precursor para outras vias metabólicas ou para fermentação, não somente a via glicolítica, cujo produto final é ácido (NELSON; COX, 2011).

Apesar de não ter sido possível detectar nenhuma alteração no consumo de glicose, pode-se afirmar que o crescimento celular (tanto para *S. mutans* quanto para *C. albicans*) foi alterado pela presença do derivado vegetal de *P. graveolens*. Haja visto, que os testes do disco de difusão apresentam valores médios que indicam uma forte interferência inibitória dose dependente do derivado vegetal de malva. Assim, apesar de não se perceber alterações no consumo de glicose, pode-se afirmar que há alterações no crescimento celular. Além disso, sabe-se que células em biofilme (onde ocorreram os testes de consumo de glicose e variação do pH) possuem resistência à agentes antimicrobianos até 1000 vezes maior do que células em crescimento (como é o caso do teste do disco de difusão) (CARLSSON; HAMILTON, 1994).

A determinação do halo de inibição do derivado vegetal de *P. graveolens* ocorreu para as cepas de *S. mutans*, nos volumes de 4, 8, 16 e 32 μL . Todos os volumes testados apresentando inibição no crescimento, sendo 32 μL , o volume que apresentou o maior halo de inibição. Não há, até o momento, relatos de estudos com derivados de *P. graveolens* apresentando atividade antimicrobiana contra *S. mutans*. Para a *C. albicans*, houve inibição do crescimento fúngico nos volumes de 16 e 32 μL , sendo que o volume de 32 μL apresentou o maior halo de inibição (1,02 cm), fato também observado por Rosato e colaboradores (2008) que realizaram teste de disco difusão com *P. graveolens*, no qual obtiveram valores de 7,3 mm de inibição para a cepa de *C. albicans* testada. Observa-se também no trabalho citado, que outras linhagens de *C. albicans* apresentam perfis diferentes de resistência ao derivado vegetal. A diferença na eficiência de inibição relatada neste trabalho em comparação

ao outro, pode ser devida aos diferentes tipos de extração de princípio ativo da mesma espécie de planta, que neste trabalho, foi obtida em extrato aquoso.

Para a avaliação da adesividade bacteriana de *S. mutans* e *C. albicans* em lamínulas de vidro, o mesmo princípio teórico empregado para se compreender a razão pela qual houve inibição no teste do disco de difusão pode ser agora empregado para a compreensão dos testes de adesividade, ou seja, as células testadas quanto à adesividade estavam inicialmente em meio planctônico, o que as tornam muito sensíveis ao derivado vegetal de *P. graveolens*, diferente das células testadas em biofilme. A formação de biofilme por microrganismos é apresentada como um dos fatores de virulência. Para os resultados obtidos, tanto as cepas de *S. mutans* quanto *C. albicans* apresentaram redução na formação do biofilme. A capacidade de redução do biofilme neste caso pode ter sido inibida por algum composto químico não conhecido do derivado vegetal de *Pelargonium graveolens* testados neste trabalho, pois a estrutura que favorece a aderência (no caso de *C. albicans*) não foi inibida.

Quanto aos efeitos do derivado vegetal de *P. graveolens* sobre a formação do tubo germinativo, nota-se efeitos semelhantes sobre o crescimento das células, mas não há alterações sobre a formação do tubo germinativo. A diminuição esperada do tubo germinativo seria um resultado que permitiria um entendimento da diminuição da virulência destas cepas, fator este que não ocorreu. Assim, a passagem da forma leveduriforme para a forma filamentosa (o qual o tubo germinativo está associado) continuou ocorrendo e, portanto, não interferindo na capacidade de virulência destas células. As hifas são as estruturas responsáveis pela aderência no tecido na qual causam o processo infeccioso, sendo o tubo germinativo a fase inicial dessa transição. Assim, conforme citado por Kato et al., (2013) a incapacidade de alterar a produção do tubo germinativo corrobora com a capacidade de virulência dessas células.

No trabalho publicado por Drumond e colaboradores (2004), o emprego de vegetais do gênero *Pelargonium* é citado, e, inclusive é citado um medicamento amplamente conhecido que tem em sua composição malva, quinosol e tirotricina. Os resultados apresentados no trabalho citado relatam efeitos bactericidas dos componentes quinosol e tirotricina e o uso do produto (Malvatricim) também possui eficácia sobre microrganismos bucais. Entretanto, sabe-se que o produto disponível

no mercado é proveniente de uma extração via etanólica (tintura) e que o derivado vegetal utilizado neste presente trabalho é obtido via extração aquosa, o que conseqüentemente leva a extração de diferentes substâncias químicas durante a extração dos derivados vegetais. Toti-Rodrigues (2008) também encontrou ação antifúngica do Malvatricin® frente a leveduras do gênero *Candida*. As variações entre os resultados podem ser sugeridas por algumas diferenças entre os produtos, uma vez que o provável princípio ativo antifúngico deste estudo seja o quinosol, que já foi relatado na literatura ter ação antifúngica (MEDICAL DICTIONARY, 2010).

Vários estudos sobre a atividade antimicrobiana e antifúngica *in vitro* de derivados vegetais estão sendo publicados, mas na maioria dos casos, as metodologias empregadas e os métodos de extração dos derivados vegetais são diferentes. Os resultados apresentados neste trabalho, apesar de que são ainda pouco conclusivos, podem indicar uma ação antimicrobiana que poderá ser melhor explicada em estudos futuros.

7 CONCLUSÕES

A análise da capacidade acidogênica e do consumo de glicose nos volumes 10, 50 e 100 µL do derivado vegetal de *P. graveolens* não são eficazes no tratamento de *S. mutans*, portanto, não apresentaram efeito antimicrobiano.

A análise do consumo de glicose nos volumes de 10, 50 e 100 µL do derivado vegetal de *P. graveolens* para *C. albicans*, também não apresentaram efeito antifúngico.

A análise do halo de inibição para a cepa de *S. mutans* apresentou efeito inibitório nos volumes de 4, 8, 16 e 32 µL do derivado vegetal *P. graveolens* contra cepas de *S. mutans*. Já para *C. albicans*, as concentrações que obtiveram melhor resultado de inibição, foram 16 e 32 µL do derivado vegetal de *P. graveolens*.

Não houve inibição da formação do tubo germinativo pelo derivado vegetal *P. graveolens* em *C. albicans*, porém, não é possível relacionar, neste caso, a produção do tubo germinativo com inibição da formação do biofilme de *C. albicans*.

A formação do biofilme em *S. mutans* foi inibida pelo derivado vegetal de *Pelargonium graveolens* na concentração analisada, podendo afirmar a atividade antimicrobiana contra o microrganismo.

Apesar dos resultados apresentados neste trabalho serem bastante promissores, há ainda a necessidade de mais estudos envolvendo os derivados vegetais de *P. graveolens* visando investigar sua ação sobre as espécies de microrganismos aqui analisadas.

8 REFERÊNCIAS

AAS, J. A. et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. **J Clin Microbiol**, v. 46, n.4, p.1407–1417, set. 2008.

AJDIC, D. et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 22, p. 14434–14439, set. 2002.

AKPAN, A.; MOGAN R. Oral candidiasis. **Postgrad. Med. J.** v. 78, p. 455-459, jul. 2002.

ALBERTSSON, W. K. et al. Effects of mouthrinses containing essential oils and alcohol-free chlorhexidine on human plaque acidogenicity. **Clin Oral Investig.** v. 14, n. 1, p. 107-112, abr. 2009.

ÁLVARES, C. A., ESTIVALET, T. I., LOPE, M. E. C. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **J Bras Patol Med Lab.** v. 43, n. 5, p. 319-327, jul. 2007.

ALVES, P. M., QUEIROZ, L. M. G., PEREIRA, J. V., PEREIRA, M. S. V. *In vitro* antimicrobial, antiadherent and antifungal activity of Brazilian medicinal plants on oral biofilm microorganisms and strains of the genus *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 222-224, mar-abr. 2009.

ANG, H. Y.; NA, S. S.; KIM, Y. K. Effects of oral care with essential oil on improvement in oral health status of hospice patients. **J Korean Acad Nurs**. v. 40, n. 4, p. 473–481, ago. 2010.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; D. AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p. 446–475, mar. 2008.

BAUER, A. W., KIRBY, W. M. M., SHERRIS, J. C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J Clin Pathol**. v. 45, p. 493-496, out. 1966.

BERMAN, J.; SUDBERY, P. E. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. **Nature Publishing Group**. v. 3, n. 4, p.918-930, jan. 2002.

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.

BOTELHO, M. A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 3, p. 349–356, jul. 2007.

Brasil, Ministério da Saúde, Departamento de Atenção Básica, Coordenação Nacional de Saúde Bucal, Projeto SB Brasil 2010—Pesquisa Nacional de Saúde Bucal, Primeiros resultados, Brasília, Brasil, 2011.

BURNE, R. A. et al. Opportunities for disrupting cariogenic biofilms. **Adv Dent Res**, v.21, n.1, p.17–20, jan. 2009.

CARLSSON, J.; HAMILTON, I. Metabolic activity of oral bacteria. In: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. (Ed.). **Textbook of Clinical Cariology**. 2ed. Copenhagen: Munksgaard, 1994. p. 71-88.

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

CHARLES, C. H.; MOSTLER, K, M.; BARTELS, L. L.; MANKODI, S, M. Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 31, n. 10, p. 878-84, out. 2004.

CHIANG, L. Y., SHEPPARD, D. C., BRUNO, V. M., MITCHELL, A. P., EDWARDS, J. E. J. R., FILLER, S. G. Candida albicans protein kinase CK2 governs virulence during oropharyngeal candidiasis. **Cell Microbiol**. v. 9, n. 1, p. 233-245, jan. 2007.

CHLEBICK, M. P.; SAFDAR, N. Topical chlorhexidine for prevention of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis. **Crit Care Med**. v. 35, n. 2, p. 595-602, jul. 2007.

CORDEIRO, C. H. G. et al. Avaliação farmacognóstica e atividade antibacteriana de derivados vegetais empregados em gel dentifício. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 8, n. 4, p. 173-182, ago. 2006.

COSTA, S, M. A Systematic Review of Socioeconomic Indicators and Dental Caries in Adults. **Int J Environ Res Public Health**. v. 9, n. 10, p. 3540–3574, out. 2012.

DE BERNARDIS, F.; SULLIVAN, P. A., CASSONE, A. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. **Med Mycol**, v. 39, n. 4, p. 303-313, fev. 2001.

DERWICH, E.; BENZIANE, Z.; BOUKIR, A. Chemical composition of leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* and evaluation of its antibacterial activity. **Int. J. Agric. Biol.**, v. 12, n. 2, p. 199-204, dez. 2010.

DHASPHER, S.G.; REYNOLDS, E.C. pH regulation by *Streptococcus mutans*. **J. Dent. Res**. v. 71, n. 6, p.1159-1165, 1991.

DMITRIEV, A. et al. CovR-Controlled Global Regulation of Gene Expression in *Streptococcus mutans*. **PLoS One**. 2011; v. 6, n. 5, p. e20127, mai. 2011.

DOUGLAS, L. J. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. **Rev. Iberoam. Micol**. v. 19, n. 4, p. 139–143, mar. 2002.

DRUMOND, M. R. S.; CASTRO, R. D.; ALMEIDA, R. V. D.; PEREIRA, M. S. V.; PADILHA, W. W. N. Comparative study *in vitro* of the antibacterial activity from phytotherapeutic products against cariogenic bacterias. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**. v. 4, n. 1, p. 33-38, jan./abr. 2004.

ELMANN, A et al. Anti-neuroinflammatory effects of geranium oil in microglial cells. **Journal of Functional Foods**. v. 2, n. 1, p. 17–22, jan. 2010.

FERRAZZA, M. H. S. H.; MALUF, M. L. F.; CONSOLARO, M. E. L.; SHINOBU, C. S.; SVIDZINSKI, T. I. E.; BATISTA, M. R. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 27, n. 2, p.58-63, jun. 2005.

FILGUEIRAS, J. L. et al. Avaliação do efeito imediato e residual do sabão anti-séptico, do PVP-I degermante, do PVP-I tópico e da clorexidina na degermação das mãos. **Rev Bras Odontol**. v. 61, n. 3, p. 195-198, jul. 2004.

FOX, R. I. Sjogren's syndrome. **Lancet**, v. 366, n. 4, p. 321-331, jul. 2005.

GABRIELLA, I. et al. Chemical Composition and Biological Properties of Rhododendron anthopogon Essential Oil. **Mol.**, v. 15, n. 4, p. 2326-2338, mar. 2010.

GHANNADI, A. et al. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Pelargonium graveolens* L'Her and *Vitex agnus-castus* L. **Iran J Microbiol**, v.4, n.4, p.171-176, dec. 2012.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quím Nova**. v. 30, v. 2, p. 374-81, ago. 2007.

GUIMARÃES, A. R. D. et al. Self-perception of side effects by adolescents in a chlorhexidinefluoride-based preventive oral health program. **Journal of Applied Oral Science, Bauru**, v. 14, n. 4, p. 291-296, abr. 2006.

HARDIE, J. M. Oral microbiology: current concepts in the microbiology of dental caries and periodontal disease. **Br Dent J**. v. 172, n. 7, p. 271–281, abr. 1992.

HENGZHUANG, W. High β -Lactamase Levels Change the Pharmacodynamics of β -Lactam Antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Antimicrob Agents Chemother**, v.57, n.1, p.196-204, jan. 2013.

HORST, J.A. et al. Strategic Protein Target Analysis for Developing Drugs to Stop Dental Caries. **Adv Dent Res**, v.24, n.2, p.86-93, sep. 2012.

HORTENSE, S. R. et al. Chlorhexidine use as a preventive and therapeutic agent in Dentistry. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 22, n. 2, p. 178-84, mai-ago. 2010.

ISLAM, B. et al. Novel Effect of Plant Lectins on the Inhibition of *Streptococcus mutans* Biofilm Formation on Saliva-coated Surface. **J Appl Microbiol**. v. 106, n. 5, p.1682-1689, mai. 2008.

JACOBSON, T. K. B. et al. Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão. **Pesqui Agropecu Trop**. v. 35, n. 3, p. 163-169, abr. 2005.

JENKINSON, H. F., LAMONT, R. J. Oral microbial communities in sickness and in health. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 12, pp. 589–595, apr. 2005.

KAJFASZ, J. K. et al. Two Spx proteins modulate stress tolerance, survival, and virulence in *Streptococcus mutans*. **J Bacteriol**. v. 192, n. 4, p. 2546–2556, out. 2010.

KATO, I. T.; PRATES, R. A.; SABINO, C. P.; FUCHS, B. B.; TEGOS, G. P.; MYLONAKIS, E.; HAMBLIN, M. R.; RIBEIRO, M. S. Antimicrobial photodynamic

inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces in vivo pathogenicity. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 57, n. 1, p. 445-451, jan. 2013.

KHAN, R. et al. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. **Molecules.** v. 14, n. 2, p. 586–597, fev. 2009.

KLEIN, T. et al. Fitoterápicos: um mercado promissory. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 30, n. 3, p. 241-248, fev. 2009.

KOŁODZIEJ, H. Traditionally used *Pelargonium* species: Chemistry and biological activity of umckaloabo extracts and their constituents. **Phytother.**, v.3, n.1, p. 77-93, jul. 2000.

KOŁODZIEJ, H.; KAYSER, O.; RADTKE, O. A. Pharmacological profile of extracts of KOO, H. et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and *tt*-farnesol. **J Antimicrob Chemother.** v. 52, n. 5, p. 782–789, nov. 2003.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. *The Yeasts: A taxonomic study.* 4ed. Amsterdam: Elsevier, 1998.

LATTE, K.; KOŁODZIEJ, H. (2000), Pelargoniins, new ellagitannins from *Pelargonium reniforme*. **Phytochemistry**, v. 54, n. 7, p. 701-708, ago. 2000.

MARINHO, B. V. S., ARAÚJO, A. C. S. Uso dos enxaguatórios bucais sobre a gengivite e biofilme dental. **International Journal of Dentistry.** v. 6, n. 4, p.124-131, Out / Dez. 2007.

MARSH, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology**, v. 149, n. 2, p. 279-294, fev. 2003.

MARTHALER, T. M. Changes in dental caries 1953–2003. **Caries Res.** v. 38, n. 3, p. 173–181, jun. 2004.

MATTOS-GRANER, R. O. Comparative analysis of Gtf isozyme production and diversity in isolates of *Streptococcus mutans* with different biofilm growth phenotypes. **J Clin Microbiol.** v. 42, n. 10, p. 4586-4592, nov. 2004.

MCCULLOUGH, M. J.; ROSS, B. C.; READE P. C. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 25, n. 7, p. 136-144, out. 1996.

McNEILL, K.; HAMILTON, I. R. Acid tolerance response of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 221, n. 17, p. 25-30, jul. 2003.

MIGLIATO, K. F. Controle de qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) **Skeels. Rev Bras Farmacogn.** v. 17, n. 1, p. 94-101, 2007.

MILLER-TORBERT, T. A.; SHARMA, S.; HOLT, R. G. Inactivation of a gene for a fibronectin-binding protein of the oral bacterium *Streptococcus mutans* partially impairs its adherence to fibronectin. **Microb Pathog.** v. 45, n. 1, p. 53-59, mar. 2008.

MULLANY, L. C. et al. Topical applications of chlorhexidine to the umbilical cord for prevention of omphalitis and neonatal mortality in southern Nepal: a community-based, cluster-randomized trial. **The Lancet.** v. 367; n.5, p. 910-918, mar. 2006.

NASCIMENTO, M. M. et. al. Adaptive Acid Tolerance Response of *Streptococcus sobrinus*. **J Bacteriol.** v. 186, n. 19, p. 6383-6390, out. 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry.** 5th ed. W. H. Freeman: New York, 2008. 1100p.

NICULAU, E. S. Contribuição à química dos compostos voláteis de *Lippi alba* (Mill) N. E. Brown e *Pelargonium graveolens* L'Herit e atividade inseticida frente à *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Dissertação de mestrado. 2011.

OZAKI, F. et al. Efficacy of a herbal toothpaste on patients with established gingivitis a randomized controlled trial. **Braz Oral Res.** v. 20, n. 2, p. 172-177, nov. 2006.

PAULINO, T. P. et al. Fermentable and nonfermentable sugars: a simple experiment of anaerobic metabolism. **Biochem. Mol. Biol. Educ.** v. 31, n. 4, p.180-184, jul. 2003.

PAULINO, T. P. et al. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. **Arch. Oral Biol.** v.50, n. 3, p. 353-359, nov. 2005.

Pelargonium sidoides and their constituents. **Phytomedicine**, v. 10, n. 4; p. 18-24, nov. 2003.

PERINETTI, G.; CAPUTI, S.; VARVARA, G. Risk/Prevention Indicators for the Prevalence of Dental Caries in Schoolchildren: Results from the Italian OHSAR Survey. **Caries Res.** v. 39, n. 1, p. 9-19, jan-fev. 2005.

PETERSEN, F. C.; ASSEV, S.; SCHEIE, A. A. Combined effects of NaF and SLS on acidand polysaccharide-formation of biofilm and planktonic cells. **Arch Oral Biol.** v. 51, n. 8, p. 665-671, nov. 2006.

PETERSEN, P. E. Sociobehavioural risk factors in dental caries, International perspectives. **Community Dent. Oral Epidemiol.** v. 33, n. 4, p. 274–279, ago. 2005.

PETERSEN, P. E. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century, the approach of the WHO Global Oral Health Programme. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 31, n. 4, p. 3-24, jan. 2003.

PETERSEN, P. E., BOURGEOIS, D., OGAWA, H., ESTUPINAN-DAY, S., NDIAYE, C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. **Bulletin of the World Health Organiz**, v. 83, n. 9, p. 661–669, jun. 2005.

PRASANTH, M. Antimicrobial Efficacy of Different Toothpastes and Mouthrinses: An In Vitro Study. **Dent Res J (Isfahan)**, v.8, n.2, p.85-94, set. 2011.

RAMAGE, G., SAVILLE, S. P., THOMAS, D. P., LÓPEZ-RIBOT, J. L. Candida biofilms: an update. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 4, p. 633-638, apr. 2005.

RAO, B. R. R. Biomass yield, essential oil yield and essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* species) as influenced by row spacings and intercropping with cornmint (*Mentha arvensis* L. f. *piperascens* Malinv. Ex Holmes). **Industrial Crops and Products**, v.16, p.133-44, out. 2002.

RAUTEMAA, R., LAUHIO, A., CULLINAN, M. P., SEYMOUR, G. J. Oral infections and systemic disease, an emerging problem in medicine. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 11, p. 1041–1047, jul. 2007.

ROGERS, T. R. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact? **Int J Antimicrob Agents**. v. 2, n. 1, p. 7-11, out. 2006.

RONCALLI, A. G. O desenvolvimento das políticas de saúde no Brasil e a construção do Sistema Único de Saúde. In: **Pereira AC. Odontologia em saúde coletiva: planejando ações e promovendo saúde**. Porto Alegre: ArtMed; 2007.

ROSATO, A. et al. The inhibition of Candida species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. **Phytomedicine**, v.15, n.8, p. 635-638, jun. 2008.

ROSENTHAL, S. et al. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. v. 98, n. 4, p. 488-92, out. 2004.

ROSENTHAL, S.; SPANBERG, L.; SAFAVI, K.; CONN, F. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. v. 98, n. 4, p. 488-92, out. 2004.

RUSSELL, A. D. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. **J Hosp Infect**. v. 57, n. 2, p. 97-104, jun. 2004.

SANTOS, E. B. et al., Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Rev Bras de Farmacog**. v. 19, n. 1B, p. 321-324, Jul. 2009.

SAXENA, G. et al. An efficient in vitro produce for micropropagation and generation of somaclones of rose scented Pelargonium. **Plant Science**, v.155, n. 2, p.133-40, jun. 2000.

SHIN, S.; LIM, S. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 6, p.1289-1296, ago. 2004.

SILVA. F. Efeito antimicrobiano *in vitro* dos compostos isolados da *Mikania glomerada* sobre os patógenos orais. [**Senior Research Project**], Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, Piracicaba, Brasil, 2005.

SILVA, J. O.; FRANCESCHINI, S. A.; CANDIDO, R. C. Presença de leveduras em mucosas e fezes de indivíduos aparentemente saudáveis e de pessoas com sintomas de infecção fúngica. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 61, n. 2, p.113-120, Nov. 2002.

SILVA, M. I. et al. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Rev Bras de Farmacog.** v, 16, n. 04, p. 455-462, out. 2006.

SIMÕES, M. Antimicrobial strategies effective against infectious bacterial biofilms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 14, p. 2129–2145, jan. 2011.

SIMON, J. E.; CHADWICK, A. F.; CRAKER, L. E. Herbs: an indexed bibliography 1971-1980: the scientific literature on selected herbs, and aromatic and medicinal plants of the temperate zone. Hamden: Archon Books, p. 770, 1984.

SIQUEIRA, J. F., SEM, B. H. Fungi in endodontic infections. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 97, n. 5, p. 632-641, mai. 2004.

SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmam G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR.

Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; 2007.

SOUZA, E. L. C. Comparação do digluconato de clorexidina 0,12% sem xilitol com álcool e com xilitol sem álcool para controle do biofilme oral e efeitos adversos associados. Dissertação (mestrado) - Universidade Veiga de Almeida, Mestrado em Odontologia, **Reabilitação Oral**, Rio de Janeiro, 2007.

TAKARADA, K. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. **Oral Microbiol Immunol**. v. 19, n. 1, p. 61-64, out. 2004.

TOLEDO, A. C. O. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, jan-dez. 2003.

TOMÁS, I. et al. In vivo bactericidal effect of 0.2% chlorhexidine but not 0.12% on salivary obligate anaerobes. **Arch Oral Biol**. v. 53, n. 12, p. 1186-1191, fev. 2008.

TORTORANO, A. M., KIBBLER, C., PEMAN, J., BERNHARDT, H., KLINGSPOR, L., GRILLOF, R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. **Int J Antimicrob Agents**. v. 27, n. 6, p.359-366, jan. 2006.

TOTI-RODRIGUES, M. L. Avaliação de testes de susceptibilidade *in vitro* de enxaguantes bucais frente a espécies do gênero *Candida*. São Paulo: Dissertação de Mestrado, 2008. 92p.

VAN NIEUWENHUYSEN, J. P.; CARVALHO, J. C.; D'HOORE, W. Status of dental caries in Belgium and neighboring countries. **Rev. Belge Med. Dent**. v. 57, n. 3, p. 186–205, jun. 2002.

WEYNE, S., HARARI, S. Cariologia: Implicações e aplicações Clínicas. In: Baratieri, L. N. Odontologia Restauradora: Fundamentos e Possibilidades. Rio de Janeiro: Santos, **Quintessence**, Cap. 1, p. 3-29, 2002.

YA-LING, L.; NASCIMENTO, M.; BURNE, R. A. Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries. **International Journal of Oral Science**, v. 4, n.5, p.135–140, jul. 2012.

YEO, B. K., LIM, L. P., PAQUETTE, D. W., WILLIAMS, R. C. Periodontal disease, the emergence of a risk for systemic conditions: pre-term low birth weight. **Annals of the Academy of Medicine Singapore**, v. 34, n. 1, p. 111–116, nov. 2005.

YONEYAMA, A.; SHIMIZU, M.; TABATA, M.; YASHIRO, J.; TAKATA, T.; HIKIDA, M. In vitro short-time killing activity of povidone-iodine (Isodine Gargle) in the presence of oral organic matter. **Dermatology**, v. 212, v. 1, p. 103-108, Mai. 2006.

ZHANG, J. Z. et al. Effect of an essential oil mouthrinse, with and without fluoride, on plaque metabolic acid production and pH after a sucrose challenge. **Caries Res.** v. 38, n. 6, p. 537-541, jun. 2004.