



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Daniela Dalcin da Rosa

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE ÓLEO
DE *Thymus vulgaris* FRENTE À *Streptococcus mutans***

Santa Maria, RS
2021

DANIELA DALCIN DA ROSA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE ÓLEO DE *Thymus vulgaris*
FRENTE À *Streptococcus mutans***

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal de Santa
Maria (UFSM-RS), como requisito
parcial para a obtenção do título de
**Mestre em Ciências
Farmacêuticas**

Orientador: Prof. Dr. Roberto Christ Vianna Santos
Co-Orientadora: Prof. Dra. Cristiane De Bona Da Silva

Santa Maria, RS
2021

ROSA, DANIELA DALCIN DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE ÓLEO DE
THYMUS VULGARIS FRENTE Á STREPTOCOCCUS MUTANS / DANIELA
DALCIN DA ROSA.- 2021.
50 p.; 30 cm

Orientador: ROBERTO CHRIST VIANNA SANTOS
Coorientadora: CRISTIANE DE BONA DA SILVA
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2021

1. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA 2. ANTIBIOFILME 3. THYMUS
VULGARIS 4. TIMOL 5. STREPTOCOCCUS MUTANS I. CHRIST
VIANNA SANTOS, ROBERTO II. DE BONA DA SILVA, CRISTIANE
III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, DANIELA DALCIN DA ROSA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

DANIELA DALCIN DA ROSA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE ÓLEO DE *Thymus vulgaris*
FRENTE À *Streptococcus mutans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), como requisito para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

Aprovado em 10 de setembro de 2021

**Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UFSM)
(Orientador)**

**Cristiane de Bona da Silva, Dra (UFSM)
(Co-orientadora)**

Dra. Pauline Cordenonsi Bonez (URI) Parecer

Dra. Liliane de Freitas Bauermann (UFSM) - Parecer

Santa Maria, RS
2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre colocar pessoas maravilhosas em meu caminho, pela minha vida, pela minha saúde e determinação.

Aos meus amores: esposo Orion Mossi da Rosa , filhos Henrique e Érika por nunca terem deixado eu desistir dos meus sonhos, me apoiarem, pelo companheirismo, e por sempre estarem ao meu lado.

A todos os colegas do Laboratório de Pesquisa de Microbiologia Oral (LAPEMICRO/UFSM), pelo companheirismo de sempre, ensinamentos e paciência.

Ao Professor Dr. Roberto Christ Vianna Santos, que me proporcionou a oportunidade de conquistar um dos meus maiores sonhos, ser mestre.

Grata a todos que estiveram presentes em minha vida, que mesmo de longe observaram a minha luta diária em conciliar o trabalho e o estudo em um momento tão delicado que vivemos no ano de 2020.

Obrigada à Universidade Federal de Santa Maria, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas: Análises Clínicas e Toxicológicas, pela oportunidade de cursar o mestrado.

RESUMO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE ÓLEO DE *Thymus vulgaris* FRENTE À *Streptococcus mutans*

AUTORA: Daniela Dalcin da Rosa
ORIENTADOR: Prof. Dr. Roberto Christ Vianna Santos
CO-ORIENTADORA: Dr^a. Cristiane de Bona da Silva

A cárie dentária ainda constitui um grande desafio, apesar de todos os meios hoje disponíveis para o seu tratamento. O desenvolvimento das lesões cariosas na cavidade bucal ocorre da combinação simultânea de vários fatores, sendo considerados primordiais, a presença de microrganismos cariogênicos, o conteúdo da dieta e uma higiene bucal incapaz de desorganizar de forma eficiente o biofilme presente na superfície dos dentes. Descrita como uma doença infecciosa, multifatorial e transmissível, a cárie é considerada pela Organização Mundial de Saúde uma das principais enfermidades de risco para a saúde bucal. Desencadeada e perpetuada por bactérias Gram-positivas, sendo que o agente etiológico primário é a bactéria *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), cuja formação de biofilme, resistência à antibioticoterapia convencional e a antissépticos bucais, exigem a busca por novos métodos coadjuvantes ao tratamento clínico. Neste enfoque, pesquisas que buscam identificar produtos naturais com atividade biológica representam uma alternativa para o tratamento dessa doença. Nesse contexto, o uso de fitoterápicos tem sido uma opção terapêutica para os profissionais de saúde que procuram novas alternativas com potencial atividade farmacológica, menor toxicidade e menores custos a população. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do óleo essencial de Tomilho (*Thymus vulgaris*) frente à *S. mutans*. Foi realizada a caracterização do óleo por cromatografia gasosa, onde se observou a presença dos componentes majoritários, timol e o-cimeno nas respectivas porcentagens de 47,40% e 27,186%. A atividade antimicrobiana foi avaliada por método convencional de microdiluição em caldo. O óleo de *T. vulgaris*, foi capaz de inibir o crescimento bacteriano em concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de 0,375mg/mL. Os testes de suscetibilidade *in vitro* foram realizados conforme CLSI, 2018. Foi avaliada a capacidade de formação de biofilme em modelo *ex vivo*, utilizando modelo de dentes bovinos. A atividade antibiofilme foi analisada através de microscopia de força atômica e contagem de microrganismos viáveis, demonstrando que o óleo de *T. vulgaris* nas concentrações de 0.75 mg/mL e 1,5 mg/mL em ambas as técnicas, promoveu redução dos biofilmes formados. Almeja-se que estes resultados possam nortear futuros estudos para a produção de formulações que possam ser utilizadas no tratamento de biofilmes causados por *S. mutans*.

Palavras-chave: Cárie.; Biofilme.; Óleo essencial; Timol; o-cimeno.

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL AND ANTIBIOFILM ACTIVITY OF THE OIL OF *Thymus vulgaris* FRONT THE *Streptococcus mutans*

AUTHOR: Daniela Dalcin da Rosa
ADVISOR: Prof^o. Dr. Roberto Christ Vianna Santos
CO-SUPERVISOR: Dr^a. Cristiane de Bona da Silva

The caries disease is still a major challenge, despite all the means available today for your treatment. The development of caries lesions in the oral cavity is the simultaneous combination of several factors, being considered primordial, the presence of cariogenic microorganisms, the content of the diet and an oral hygiene incapable of efficiently disorganizing the biofilm present on the surface of the teeth. Described as an infectious, multifactorial and transmissible disease, it is considered by the World Health Organization one of the main risk diseases for oral health. Triggered and perpetuated by Gram-positives, where the primary etiologic agent is the bacterium *Streptococcus mutans*, whose biofilm formation, resistance to conventional antibiotic therapy and oral antiseptics, require the search for new methods to support clinical treatment. In this approach, research that seeks to identify natural products with biological activity represent an alternative for the treatment of this disease. In this context, the use of herbal medicines has been a therapeutic option for health professionals who seek new alternatives with potential pharmacological activity, less toxicity and lower costs to the population. The present work had as objective to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil of Thyme (*Thymus vulgaris*) against *S. mutans*. The oil characterization was performed by GC-FID and GC-MS, where it was observed the presence of major components, o-cymene and thymol in their respective percentages of 47,40% and 27,186%. The antimicrobial activity was evaluated by a conventional broth microdilution method. The *T. vulgaris* oil was able to inhibit bacterial growth at a minimum inhibitory concentration (MIC) and a minimum bactericidal concentration (CBM) of 0.375mg/mL, in vitro susceptibility tests were performed according to CLSI 2018. The capacity of biofilm formation was evaluated in an ex vivo model, using a bovine teeth model. The antibiofilm activity was analyzed through atomic force microscopy and viable microorganisms counting, demonstrating that the *T. vulgaris* oil at concentrations of 0.75 mg/mL and 1.5 mg/mL in both techniques promoted a reduction in the formed biofilms. It is hoped that these results can guide future studies for the production of formulations that can be used in the treatment of biofilms caused by *S. mutans*.

Keywords: Caries; Biofilms ; Essential oil, Thymol; o-cymene.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais componentes do óleo essencial estudado.....	30
Tabela 2: Composição percentual do óleo essencial de <i>T.vulgaris</i>	31
Tabela 3: Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo de <i>T. vulgaris</i>	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formação de biofilme. Células planctônicas aderem reversivelmente a uma superfície. À medida que proliferam, produzem componentes da matriz extracelular enquanto motilidade e outros fatores de virulência são inibidos. Por fim, algumas células se desprendem do biofilme e voltam a forma planctônica.....	14
Figura 2: Imagem de biofilme formado de <i>S.mutans</i>	16
Figura 3: Tomilho (<i>Thymus vulgaris L</i>).	19
Figura 4: Estrutura química dos compostos timol (a) e carvacrol (b).	20
Figura 5: Cromatograma do óleo essencial de <i>T.vulgaris</i> 1 – α -pineno; 2 – o-cimeno; 4 - γ -terpineno; 5-linalol ,6-timol ; 7-carvacrol.....	30
Figura 6: Estrutura química dos componentes majoritários do óleo essencial de <i>T.vulgaris</i> - – o- cimeno - γ -terpineno; -linalol ; -timol.....	31
Figura 7: Contagens médias de formação de unidades formadoras de colônias (UFCs) nas diferentes soluções. Os resultados estão expressos em porcentagem (Média \pm Erro padrão da média). C+: Controle Positivo (Solução NaCl 0,85%). CHX 0,12% - Clorexidina 0,12% OL MIC Óleo de <i>T. Vulgaris</i> 0,375 mg/mL, OL 2XMIC- Óleo de <i>T. Vulgaris</i> 0,75 mg/MI, OL 4XMIC- Óleo d <i>T. Vulgaris</i> 1,5 mg/mL. A análise estatística será realizada utilizando ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Dunnett. O dados serão representados como a média \pm SEM. Será utilizado o software Graph Prism 6.01. a - Diferença significativa com relação ao controle positivo. b – Diferença significativa com relação a CHX 0,12%.....	32
Figura 8: Análise da superfície do CP. Imagem obtida através de MFA demonstrando a presença do biofilme formado por <i>S mutans</i> - Controle positivo	33
Figura 9: :Análise da superfície do CP. Imagem obtida através de MFA demonstrando biofilme formado por <i>S. mutans</i> ao utilizar OL 1MIC.	33
Figura 10: Análise da superfície do CP. Imagem obtida através de MFA demonstrando a redução do biofilme formado por <i>S. mutans</i> ao utilizar OL 2MIC,ao promover redução na sua amplitude.	33
Figura 11: Análise da superfície do CP. Imagem obtida através de MFA demonstrando a redução do biofilme formado por <i>S. mutans</i> ao utilizar OL 4MIC.	34
Figura 12: Análise da superfície do CP. Imagem obtida através de MFA demonstrando a redução do biofilme formado por <i>S. mutans</i> ao utilizar CHX 0,12%.....	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1 BIOFILME DENTÁRIO E DOENÇA CÁRIE.....	13
3.1.1 <i>S. mutans</i>	15
3.2 TRATAMENTO DA DOENÇA CÁRIE.....	16
3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	17
3.3.1 <i>TOMILHO (T. vulgaris)</i>	18
4 MANUSCRITO	22
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÃO	44
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	45
REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

No decorrer das décadas, com o advento das pesquisas na área odontológica, foi estabelecido que o acúmulo de “placa” dentária, também chamado biofilme oral, é um potencial agente causador da cárie, tendo *S. mutans* como principal bactéria oral responsável pela iniciação e progressão dessa doença (MARSH, 2004). O microrganismo *S. mutans* é caracterizado por ser uma bactéria Gram-positiva que se apresenta agrupada aos pares ou em cadeias, são anaeróbios facultativos e requerem meios nutricionalmente ricos para seu crescimento (MARSH& MARTIN 1992).

Neste contexto, o termo biofilme pode ser definido por um ecossistema ou comunidade microbiológica complexa, caracterizado por apresentar células sésseis, as quais possuem adesão a um substrato ou podem estar aderidas entre si e inseridas em uma matriz formada de polissacarídeos extracelulares de produção própria. As bactérias presentes em biofilmes encontram-se protegidas do sistema imunológico e da exposição a antimicrobianos, o que acarreta em problemas na sua erradicação (CAIXETA, 2008; SALDANHA, 2013). A remoção do biofilme bacteriano é considerado o elemento mais decisivo na prevenção e tratamento desta doença (ATABEK et al., 2012).

No entanto, a desestruturação desse biofilme dentário torna-se um desafio, pois muitos pacientes são incapazes ou desmotivados para realizar esse procedimento com a regularidade e eficiência que se é necessária. Dessa maneira o uso de agentes químicos associada a bochechos se torna imprescindível. Portanto enxaguatórios bucais com adjuntos químicos tem sido cada vez mais indicados e estudados, com o objetivo de melhorar o controle do biofilme (BATTINO M,et al .,2002). Frente a isso, os óleos essenciais têm sido estudados como uma alternativa para inibir a colonização bacteriana, impedindo a formação de biofilme na cavidade oral e conseqüentemente diminuindo a prevalência da doença cárie.

A utilização de produtos naturais com fins medicinais é uma prática milenar. Sabe-se que as plantas medicinais possuem em sua constituição compostos com atividade biológica, também chamados metabólitos secundários, que auxiliam na cura e no tratamento de várias doenças. Os óleos essenciais extraídos das plantas têm sido largamente empregados por suas propriedades já observadas na natureza, ou seja, por sua ação antibacteriana e antifúngica(ANDRADE et al., 2007).

Também chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, os óleos essenciais estão presentes nas plantas, onde seus principais constituintes são principalmente os derivados terpênicos, os quais são responsáveis pelas suas propriedades organolépticas e terapêuticas (MIRANDA et al., 2016; SOLORZANO-SANTOS, et al., 2012).

Dentre a diversidade de óleos essenciais existentes na natureza, encontra-se o óleo essencial derivado da família Lamiaceae, *Thymus vulgaris*, popularmente conhecido como óleo essencial de tomilho (BERWICK, 1996). Seu óleo, considerado responsável pelas atividades atribuídas a essa planta, apresenta ações antisséptica, expectorante, carminativa e antiespasmódica. Sua atividade biológica está relacionada com o timol e o carvacrol. O timol tem demonstrado efeitos antibacterianos, antifúngicos e anti-helmínticos, enquanto o carvacrol tem sido estudado por seus efeitos bactericidas (CARRETTO et al., 2007).

A cárie dentária é uma doença infecciosa, multifatorial e que representa um dos maiores desafios da odontologia, sendo considerado um problema de saúde pública. De acordo com a OMS, a cárie dentária é uma doença cara, que consome de 5 -10% dos orçamentos da saúde nos países industrializados para tratamento (WHO, 2017). Essa é a causa mais frequente da perda de dentição permanente de acordo com a *Global Burden of Disease* (GBD 2015), afetando cerca de de 2,3 bilhões de pessoas (VOS et al 2015).

Nesse sentido, grandes esforços são destinados na busca de terapias capazes de prevenir ou erradicar biofilmes dentários, incluindo a pesquisa de novos compostos eficazes na prevenção e controle das patologias da cavidade oral. Portanto, torna-se de fundamental interesse científico os estudos realizados a fim de se conhecer os mecanismos ambientais, moleculares e genéticos envolvidos na formação de biofilmes. Da mesma forma, a avaliação da efetividade de novos agentes antimicrobianos e biocidas frente a essas estruturas se mostra necessária e pertinente de modo que a utilização de óleos essenciais com atividade antimicrobiana pode resultar em melhoria da resistência à colonização microbiana e mitigação do desenvolvimento de biofilmes. Além disso, os óleos essenciais apresentam menores efeitos colaterais devido as baixas concentrações dos ingredientes ativos e possuem menor custo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar atividade antimicrobiana e antibiofilme do óleo essencial de *T. Vulgaris* frente à *S. mutans* formador de biofilme.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o óleo de *T. vulgaris*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo através da Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) frente à cepa *S. mutans* (ATCC 25175);
- Avaliar a cinética de formação de biofilme em modelo *ex vivo*;
- Avaliar a atividade antibiofilme do óleo de *T. vulgaris* sobre biofilmes formados por *S. mutans* por meio da contagem de microrganismos viáveis e Microscopia de Força Atômica.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 BIOFILME DENTÁRIO E DOENÇA CÁRIE

O termo biofilme pode ser definido por um ecossistema ou comunidade microbiológica complexa, caracterizada por células que possuem adesão irreversível a um substrato ou podem estar aderidas entre si. Estas células, denominadas sésseis, são encontradas envoltas por uma matriz extra de polissacarídeos autoproduzida. Estes ainda podem interagir de modo isolado ou combinado devido a esta matriz (CAIXETA, 2008). Os microrganismos que vivem no interior do biofilme apresentam uma série de vantagens em relação aos seus homólogos de vida livre, isso se deve ao fato dos aglomerados de bactérias apresentarem maior disponibilidade de nutrientes, interferindo nas taxas de crescimento, cooperatividade metabólica e proteção aos fatores externos (BEHLAU; GILMORE, 2008).

Desta forma, as bactérias presentes em biofilmes encontram-se protegidas do sistema imunológico e da exposição aos antimicrobianos, potencializando a dificuldade de seu tratamento, podendo o biofilme tornar-se 10 a 1000 vezes mais resistente aos seus efeitos (CAIXETA, 2008; MAHO'TOOLE, 2001; SALDANHA, 2014). A alta resistência dos biofilmes aos antimicrobianos, em comparação com as células livres é de grande relevância clínica (THEIN et al., 2009).

A formação de biofilme ocorre em pelo menos cinco passos sequenciais como é mostrado na figura 1: inicialmente o microrganismo em sua forma planctônica se adere à superfície, este processo ocorre através das interações físico-químicas não específicas entre a bactéria e a superfície abiótica (inanimada, plástico e metais por exemplo), essa interação ocorre aleatoriamente, através de força gravitacional, movimento browniano ou de forma ordenada, através de mecanismos de cada patógeno como: quimiotaxia e motilidade através de flagelos e pili, este estado é reversível (MORAES, et al., 2013; TRENTI et al.; 2013). A adesão em superfícies bióticas (células, tecidos animais e vegetais por exemplo), se dá através de interações moleculares mediadas por ligações específicas (ligante-receptor).

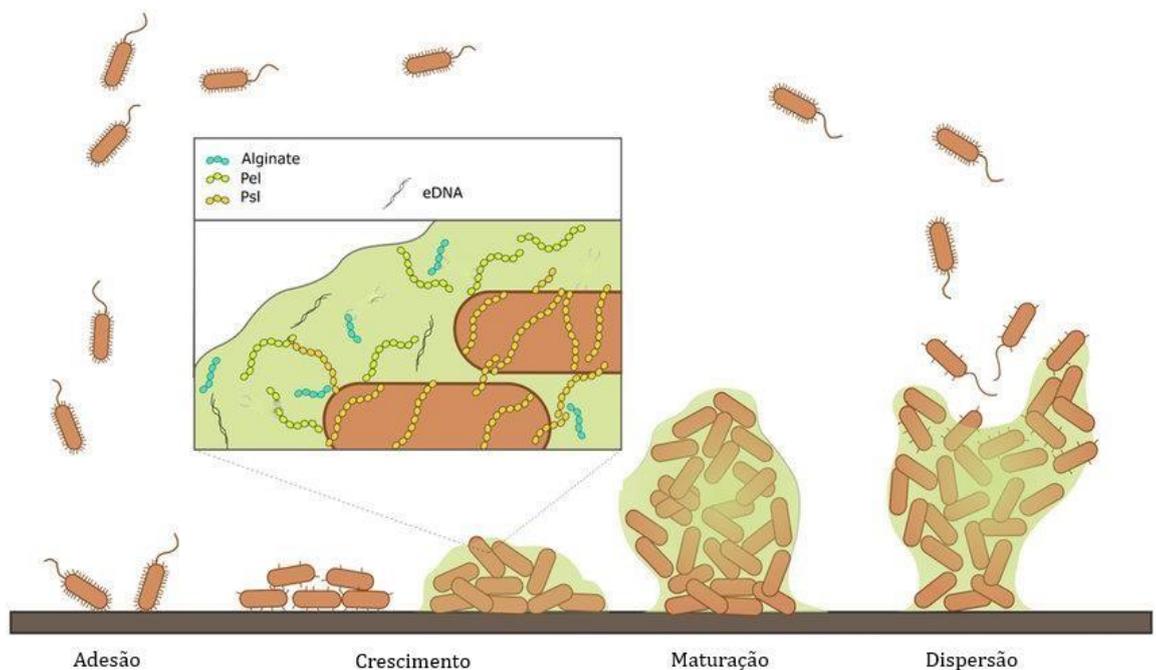
Depois de aderidos, ocorre a proliferação destes microrganismos levando a um acúmulo dos mesmos, que irão produzir metabólitos que atrairão outros microrganismos, produzindo em conjunto uma matriz de exopolissacarídeo (EPS), que

funcionará como uma proteção para a comunidade bacteriana frente a alterações de pH, temperatura, umidade, produção de toxinas, expressão dos fatores de virulência e até mesmo troca plasmidial (DONLAN, et al, 2001; CAIXETA, 2008; FLACH, 2005).

A segunda etapa consiste na adesão secundária ou irreversível, onde os colonizadores primários passam a se multiplicar, formando macro-colônias, as quais começam a sintetizar EPS, estabelecendo o processo de adesão. Após estruturado, começa haver trocas entre o meio interno e o externo, que ocorrem devido ao gradiente de concentração e pelos sinalizadores produzidos pelos microrganismos (MENOITA, 2012).

Na próxima etapa, ocorre o processo de dispersão/deslocamento ou desprendimento de porções de biofilme, isso pode ocorrer devido ao ambiente não se encontrar mais favorável, por alterações ambientais, ou devido a programação celular exercidas pelas próprias bactérias. Podem ocorrer no intuito de “crescimento” da área acometida pelo biofilme, incidindo o desprendimento de células mais externas a matriz, ou pelo processo de abrasão, devido a constantes colisões que ocorrem entre a superfície em que o biofilme está aderido e o meio em que se encontra (XAVIER, 2002; MENOITA, 2012; TRENTIN, et al., 2013).

Figura 1: Formação de biofilme. Células planctônicas aderem reversivelmente a uma superfície. À medida que proliferam, produzem componentes da matriz extracelular enquanto motilidade e outros fatores de virulência são inibidos. Por fim, algumas células se desprendem do biofilme e voltam a forma planctônica.



Fonte: Adaptado de MAUNDERS (2017)

Os biofilmes permitem a coexistência de diferentes microrganismos em sua estrutura, podendo ser de mesma espécie ou não. Podem estar presentes em muitos utensílios hospitalares, como por exemplo, lentes de contato, catéteres e implantes mamários, resultando em infecções resistentes (DONLAN, 2001; VICKERY, et al., 2004). Além de colonizarem materiais hospitalares, os biofilmes são grandes problemas em indústrias, gerando danos e entupimentos em tubulações, circuito de água e esgoto, entre outros (SANDHOLM; WIRTANEN, 1992).

Acometendo também a cavidade oral, as placas dentárias que são complexos microbianos encontrados na superfície dos dentes, também são causadas por biofilmes. Estes, são encontrados em dentes de indivíduos saudáveis ou doentes, e estão diretamente associados com a formação de cáries e doenças periodontais (ARWEILER, 2004).

A cárie dentária é uma doença multifatorial, infecciosa, transmissível, dependente do aproveitamento de carboidratos fermentáveis causada por biofilme microbiano composto por microrganismos acidogênicos e acidúricos, aderidos sobre as superfícies dentárias. Quanto maior for a exposição dos tecidos dentários a condições críticas de pH, maiores serão as chances de evidenciar sinais clínicos provenientes do processo de cárie dentária, como manchas brancas e cavidades em esmalte e dentina. (SELWITZ, ISNAIL et al., 2007).

O agente etiológico primário da cárie é *S. mutans*, porém *Streptococcus sobrinus* e o *Lactobacillus* têm também implicações nesta doença (SHANMUGAM, K. T. et al., 2013).

3.1.1 *S. mutans*

S. mutans tem sido referido como a principal espécie responsável pela cárie dental. Trata-se de um microrganismo Gram-positivo, organizado em pares ou cadeias, anaeróbio facultativo, que forma biofilmes nas estruturas dentais, infiltra em fissuras e pode desmineralizar o esmalte e a dentina com produção de ácidos. Nessas fissuras ele está bem protegido do oxigênio e da atividade antimicrobiana natural da saliva (GOREE et al., 2006). Habitualmente são isolados da orofaringe, do sistema gastrointestinal e do sistema urinário. A patogenicidade do *S. mutans* está diretamente relacionada em sua capacidade de produzir grandes quantidades de ácidos orgânicos

(acidogenicidade) e de tolerar o ambiente ácido (aciduridade), isso o torna a espécie mais numerosa no biofilme cariogênico (LEMOS et al., 2008). Além dessas características, a elevada capacidade de adesão e colonização da superfície dos dentes, fazem do *S. mutans* o principal agente microbiano associado ao desenvolvimento de lesões de cárie (BANAS et al., 2003). A partir do biofilme oral, o *S. mutans* pode causar bacteremia, quando ele atinge a corrente sanguínea devido a lesões na cavidade oral, ou devido a extrações dentárias. A presença deste microrganismo na corrente sanguínea pode causar colonização em alguns órgãos, como as válvulas cardíacas, causando endocardite, principalmente em pacientes com lesões preexistentes (FIGUEIRA et al.2020)

Figura 2: Imagem de biofilme formado de *S.mutans*.



Fonte: Galeria de imagens da escola de saúde da Universidade de Peters. Disponível em: <http://eyemicrobiology.upmc.com/PhotoGalleryBiofilms.html>

3.2 TRATAMENTO DA DOENÇA CÁRIE

O processo da cárie dentária é dinâmico, inevitável, ocorrendo durante toda a vida do indivíduo, porém pode ser controlada (DE MOURA et al., 2009).

O elemento decisivo na prevenção e tratamento da doença cárie é a remoção do biofilme, entretanto a erradicação de biofilmes microbianos é uma tarefa difícil frente às limitações dos métodos mecânicos de higiene. Agentes antimicrobianos têm então sido propostos com a finalidade de inibir a formação e o crescimento bacteriano, e conseqüentemente a adesão de microrganismos à superfície do dente, em particular de bactérias (PINHEIRO et al., 2012).

Anos de pesquisas documentadas estabeleceram que o digluconato de clorexidina (CHX) é seguro, estável e efetivo no controle do biofilme dental, sendo

considerado o agente químico padrão-ouro dentre os enxaguatórios (GUNSOLLE,2010).

Apesar da clorexidina ser considerada o padrão ouro dos enxaguatórios bucais, seu uso a longo prazo é limitado pelos efeitos adversos, como manchamento dos dentes e restaurações, alteração no paladar e aumento na formação de cálculo (ADDY, 1983), por outro lado, o cloreto de cetilpiridíneo e o triclosan em uso prolongado também apresentam efeitos indesejáveis, como sensação de ardência na língua e mucosas, manchas extrínsecas, devido a interação do cetilpiridíneo com os corantes utilizados nos alimentos (SHEEN, OWENS; ADDY, 2001).

Neste contexto, em Odontologia, pesquisas com produtos naturais como os óleos essenciais têm crescido nos últimos anos, devido à procura por novos produtos com maior atividade farmacológica, com menor toxicidade e com maior biocompatibilidade, além de apresentar valores mais acessíveis à população (ABREU-PINHEIRO et al., 2012).

3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

Óleos essenciais (OE) ou essências vegetais aromáticas, são substâncias voláteis perfumadas com consistência oleosa, tipicamente produzidas pelas plantas, sintetizadas por todos os órgãos vegetais, ou seja, por brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, madeira ou casca, sendo armazenados em células secretoras, cavidades, canais e células epidérmicas (BAKKALI et al.,2008).

Apresentam misturas complexas e voláteis de até 60 componentes bioativos distintos, caracterizando-se por exibir 2 ou 3 constituintes majoritários que compõem cerca de 20-70% do óleo. O constituinte majoritário, em geral, é o responsável pela atividade do óleo. (HÜSNÜ; BAŞER; DEMIRCI, 2007).

Os componentes dos óleos essenciais são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas e entre as principais classes de substâncias que as compõe estão os monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides (SIMÕES et al., 2007).

A primeira menção em relação aos óleos essenciais serem usados para fins terapêuticos está no papiro de Ebers, onde mais de 800 produtos e tratamentos foram listados (VIGAN, 2010). Desde então, os óleos essenciais são reconhecidos por suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e antioxidante (BHATTI et al., 2014.). Suas propriedades têm sido exploradas ao longo da história para uma série de

aplicações. Na sociedade moderna, tem relevância em setores como: indústria alimentícia, de fragrâncias, farmacêutica, cosmética e na medicina complementar e alternativa através da aromaterapia.

Diversos óleos essenciais possuem ótima atividade antimicrobiana contra uma série de microrganismos planctônicos e inclusive sobre biofilmes (SULISTYANI et al., 2016; HANS et al., 2016; SADARI et al., 2003). Entretanto, seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado. Pesquisas sugerem que os terpenóides se difundem na membrana celular, danificando-a irreversivelmente, causando a morte bacteriana, pois devido à natureza lipofílica desses compostos, os mesmos aumentam a permeabilidade celular, resultando na perda dos constituintes da célula, alterando sistemas enzimáticos, reduzindo a produção da energia e a síntese de componentes estruturais da célula, podendo ocasionar a inativação ou a destruição do material genético (COX et al., 2000; KNAAK; FIUZA., 2010).

3.3.1 TOMILHO (*T. vulgaris*)

O tomilho, conhecido cientificamente como *T. vulgaris* é uma planta medicinal aromática e condimentar, cuja espécie pertence à ordem *Lamiales*, da família *Lamiaceae*, e do gênero *Thymus*. Esta planta é originária da Europa e é cultivada no sul e sudeste do Brasil (PORTE & GODOY, 2001). *T. vulgaris* é um subarbustoperene, ereto, ramificado, muito aromático, de 20-30 cm de altura, com ramos levemente cobertos de pelos brancos e de folhas simples pequenas, verde escuras, de forma oval e com comprimento entre 6 a 12 mm., conforme mostra a figura 3. É utilizado como planta medicinal e como especiaria, seu óleo essencial tem atividades antimicrobianas e antioxidantes comprovadas (NASCIMENTO et al., 2000). Seu cultivo não demanda muitas exigências, prefere regiões secas, áridas, solos arenosos e calcáreos (CASTRO & CHEMALE, 1995).

Figura 3: Tomilho (*Thymus vulgaris* L.).

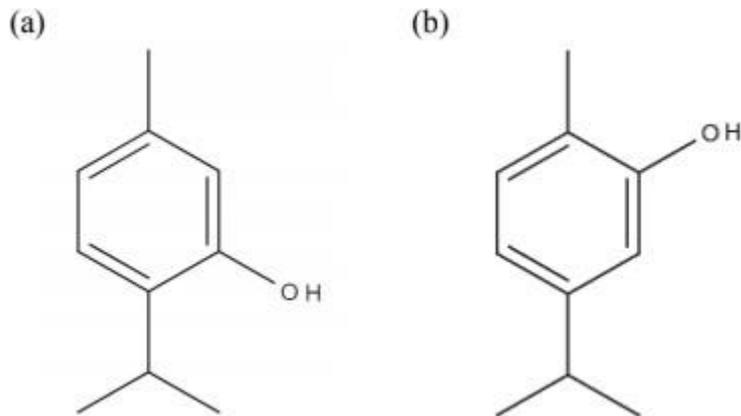


Fonte: Próprio autor

A maioria dos óleos de *T. vulgaris* são ricos nos compostos fenólicos timol e carvacrol, relacionados com muitas atividades biológicas, como efeito antimicrobiano, antifúngico e anti-helmíntico (GUTIÉRREZ LARRAÍNZA et al., 2012). Apesar da composição ser muito diferente de um local para outro, o timol pode representar de 10 a 64% do óleo e seu isômero carvacrol entre 2 a 11%. Outros compostos em concentrações relevantes, identificados e normalmente presentes são o γ -terpineno (2-31%) e o *p*-cimeno (10- 56%) (BURT,2004).

O óleo essencial de *T. vulgaris* possui ação antisséptica, expectorante, carminativa e antiespasmódica, sendo que sua atividade biológica está relacionada aos seus principais constituintes: o timol e o carvacrol., cujas estruturas químicas podem ser visualizadas na figura 4.

Figura 4: Estrutura química dos compostos timol (a) e carvacrol (b).



Fonte: Próprio autor

O timol tem demonstrado efeitos antifúngicos, antibacterianos e anti-helmínticos, e o carvacrol tem sido estudado por seus efeitos bactericidas (SAKURAI et al.,2016).

A ação bactericida sobre as bactérias Gram positivas e negativas do óleo de tomilho se deve à combinação de seus componentes. O mecanismo de ação do timol e de seu isômero carvacrol sobre os microrganismos se dá através do rompimento da membrana citoplasmática da parede das bactérias Gram negativas. Já o p- cimeno, por ser uma substância hidrofóbica, gera um inchaço exacerbado da membrana citoplasmática, fragilizando-a (BARBOSA, LN,2010).

FANI et al (2017) testaram o óleo frente a isolados de *Streptococcus pyogenes*, *S. mutans*, *Candida albicans*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gengivalis* onde os dados apresentados neste estudo revelaram forte atividade antimicrobiana *in vitro*. Outro estudo realizado por Gonçalves e colaboradores (2011), demonstrou o efeito inibitório do óleo de tomilho sobre *S. mutans*.

Reyes-Jurado e colaboradores (2003) verificaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais comerciais de orégano (*Lippia berlandieri*), tomilho (*T. vulgaris*) e mostarda (*Brassica nigra*) contra uma série de bactérias e fungos por meio do teste de difusão em fase de vapor por cromatografia gasosa. Os óleos apresentaram atividade antimicrobiana significativa, sugerindo que os óleos testados podem ser usados para proteger alimentos embalados contra o crescimento de microrganismos.

Em 2020, DE OLIVEIRA CARVALHO e colaboradores realizaram um estudo onde evidenciaram que o óleo essencial e cremes dentais contendo óleo essencial de

cravo, canela, orégano e tomilho foram altamente eficazes em inibir o crescimento de *S. mutans* e interromper os biofilmes pré-formados.

4 MANUSCRITO

Título: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE ÓLEO DE *Thymus vulgaris*
FRENTE À *Streptococcus mutans*

Daniela Dalcin da Rosa^a, Vanessa Schopf Machado^a, Ticiane Rosa Pinheiro^a
Kelly Schneider Moreira^b, Thiago Burgo^{b*}, Roberto Christ Vianna Santos^{a*}

Após a realização das alterações sugeridas pela banca examinadora, o manuscrito abaixo será traduzido para o Inglês e será submetido para o periódico ***Microbial Pathogenesis*** (Fator de impacto: 2.914, Qualis: B2).

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE ÓLEO DE *Thymus vulgaris*
FRENTE À *Streptococcus mutans***

Autores Daniela Dalcin da Rosa^a, Vanessa Schopf Machado^a, Ticiane Rosa Pinheiro^a, Kelly Schneider Moreira^b, Thiago Burgo^{b*}, Roberto Christ Vianna Santos^{a*}.

^a Oral Microbiology Research Laboratory, Microbiology and Parasitology Department, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Brazil. Laboratório de Parasitologia Veterinária (LAPAVET), Microbiology and Parasitology Department, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Brazil

^b Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria/RS, Brazil.

Corresponding author

^{a*} Prof. Roberto Christ Vianna Santos, PhD, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Oral. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria. Av. Roraima 1000 - CEP 97105-900. Santa Maria - RS - Brasil
E-mail: robertochrist@gmail.com

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do óleo essencial de Tomilho (*T. vulgaris*) frente à *S. mutans*, conhecido como potencial formador de biofilme. Foi realizada a caracterização do óleo por cromatografia gasosa, onde se observou a presença dos componentes majoritários, timol e o-cimeno nas respectivas porcentagens de 47,40% e 27,186%. Foi avaliada a capacidade de formação de biofilme em modelo *ex vivo*, utilizando modelo de dentes bovinos. Avaliando o potencial antimicrobiano pela técnica de microdiluição em caldo, *T. vulgaris* apresentou atividade antimicrobiana, sendo capaz de inibir o crescimento bacteriano em concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de 0,375 mg/mL. A atividade antibiofilme foi analisada através de microscopia de força atômica e contagem de microrganismos viáveis, demonstrando que o óleo de *T. vulgaris* nas concentrações de 0,75 mg/mL e 1,5 mg/mL em ambas técnicas, promoveu redução dos biofilmes formados. A microscopia de força atômica indicou a ação positiva do OL na destruição do biofilme, ao promover diminuição da sua amplitude. Almeja-se que estes resultados possam nortear futuros estudos para a produção de formulações que possam ser utilizadas no tratamento de biofilmes causados por *S. mutans*.

Palavras-chave: Cárie.;Biofilme;.Óleo essencial; Timol; o-cimeno

1.INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais, particularmente da flora, com fins medicinais, nasceu com a humanidade. Sabe-se que as plantas medicinais possuem em sua constituição compostos com atividade biológica (metabólitos secundários), que auxiliam na cura e no tratamento de várias doenças (ANDRADE et al; 2007). Os óleos essenciais extraídos das plantas têm sido largamente empregados por suas propriedades já observadas na natureza, ou seja, por sua ação antibacteriana, atividade antifúngica e inseticida. Os constituintes dos óleos essenciais são principalmente os derivados terpênicos, como os mono e sesquiterpenos e os fenilpropanóides (SOLORZANO-SANTOS, MIRANDA-NOVALES, 2012), os quais são responsáveis pelas suas propriedades organolépticas e terapêuticas (MIRANDA et al, 2016).

O tomilho (*T. vulgaris*) é uma planta medicinal, aromática e condimentar, pertencente à família Lamiaceae. Seu óleo, considerado responsável pelas atividades atribuídas a essa planta, apresenta ações antisséptica, expectorante, carminativa e antiespasmódica. Sua atividade biológica está relacionada com o timol e o carvacrol. O timol tem demonstrado efeitos antibacterianos, antifúngicos e anti-helmínticos, enquanto o carvacrol tem sido estudado por seus efeitos bactericidas (CARRETTO et al, 2007).

No decorrer das décadas, com o advento das pesquisas na área odontológica, foi estabelecido que o acúmulo de placa dentária é um potencial agente causador da cárie, tendo como principal bactéria oral responsável pela iniciação e progressão da cárie dentária, o *Streptococcus mutans* (MARSH, 2004). A cárie consiste na condição infecciosa oral mais prevalente em seres humanos, sendo a remoção do biofilme bacteriano o elemento decisivo na prevenção e tratamento destas doenças (ATABEK et al, 2012).

Nesse contexto, os óleos essenciais têm sido estudados como uma alternativa para inibir a colonização bacteriana, impedindo a formação de biofilme na cavidade oral e conseqüentemente diminuindo a prevalência da doença cárie. (DE OLIVEIRA et al 2017).

Diante disso, este estudo teve como objetivo, avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do óleo de *T.vulgaris* frente a *S. mutans*.

2.MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.Microrganismo

Foi utilizada cepa padrão de *S. mutans* ATCC 25175, formadora de biofilme.

2.2.Obtenção e caracterização do óleo

O óleo essencial de *T. vulgaris* foi extraído em escala industrial por hidrodestilação a arraste de vapor pela Empresa Ferquima Ind. e Comércio de Óleos Essenciais Vargem Grande Paulista, São Paulo. As partes utilizadas foram folhas e cascas dos frutos.

A análise fitoquímica do óleo essencial foi realizada no NTA (Núcleo de Tecnologia de Alimentos) da UFSM. A caracterização do óleo essencial de *T. vulgaris* foi realizada em um cromatógrafo a gás Varian Star 3400CX (CA, EUA) equipado com um detector de ionização de chama (GC-FID) segundo metodologia de Teixeira et al (2014) com modificações. Para análise do óleo, 5µL do óleo foi diluído em 1mL de hexano e uma alíquota de 1µL da solução foi injetada na porta de injeção do cromatógrafo a uma temperatura de 250 °C no modo *split* de razão 1:30. Os compostos foram separados numa coluna capilar apolar de sílica fundida BPX 5 (25 m × 0.22 mm × 0.25 µm, SGE, Australia). O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a uma pressão constante (15 psi). A temperatura inicial da coluna foi ajustada para 50 °C e mantida durante 0,5 min. Em seguida, um gradiente de temperatura foi iniciado subindo a 4 °C min⁻¹ até 80 °C, e depois até 260 °C por um aumento a 10 °C min⁻¹, e mantida em condições isotérmicas durante 2 min. A temperatura do detector foi mantida a 250 °C. Uma série de n-alcenos homólogos foram analisados sob as mesmas condições cromatográficas para calcular o índice de retenção linear (IRL). (VIEGAS et al 2007).

A análise qualitativa dos compostos foi efetuada por um cromatógrafo gasoso Shimadzu QP2010 Ultra acoplado a espectrômetro de massas (GC/MS, Shimadzu Corporation, Quioto, Japão). Para estas análises, foram usadas as mesmas condições cromatográficas acima descritas e hélio foi utilizado como o gás de arraste. O detector foi operado no modo de ionização por impacto de elétrons com uma energia de ionização de 70 eV e um intervalo de varredura de massas 35-350 m/z. Os analitos foram identificados com base na comparação com os espectros de massas disponível na biblioteca *National Institute of Standards and Technology* (NIST) e por comparação

dos índices de retenção linear calculados com aqueles disponíveis na literatura científica. (ADAMS, 2007)

2.3. *Dentes bovinos*

Foram utilizados como corpos de prova, dentes bovinos extraídos de animais abatidos em abatedouro local. Conforme Lei nº 11.794/2008 não é necessária submissão de projeto ao Comitê de Ética no uso de Animais para obtenção dos dentes.

2.4. *Testes de atividade antimicrobiana*

2.4.1. *Preparação do inóculo*

O inóculo da cepa *S. mutans* ATCC 25175 foi padronizado de acordo com o protocolo M07-M09 aprovado pelo “*Clinical and Laboratory Standards Institute*”(CLSI 2018). Colônias isoladas foram cultivadas por 24 -48 horas em ágar Brain Heart Infusion (BHI) e a suspensão foi preparada em solução salina (NaCl 0,85%) com densidade ajustada para 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU / mL) .

2.4.2. *Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)*

A diluição do óleo essencial de *T. vulgaris* foi realizada em tubo de ensaio estéril em proporção de 1:10, onde foram adicionados 10% do óleo essencial, 10% de Tween 80 (polissorbato) e 80 % de água destilada., esta solução foi agitada em vórtex (Mod AP56, Phoenix) a fim de se obter uma concentração de 6 mg/mL.

A CIM foi determinada pelo método de microdiluição em caldo utilizando placas de 96 poços padronizado de acordo com o protocolo M07-M09 aprovado pelo “*Clinical and Laboratory Standards Institute*”(CLSI 2018). Resumidamente foram adicionados em todos os poços 100 µL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), em seguida foram adicionados 100 µL do óleo na coluna 1 e foi realizada a diluição seriada até a 10ª coluna. As faixas de concentrações finais do óleo nos poços das placas de microtitulação foram de 6-0,04687 mg/mL. O inóculo foi preparado na escala 0,5 McFarland, e diluídos 1:20, apresentando aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Após a realização da diluição, foi adicionado 10 µL do inóculo bacteriano em cada poço, exceto na coluna 11 (controle negativo). O controle positivo foi realizado na 12ª coluna, considerado o poço com o inóculo e caldo

BHI, enquanto o controle negativo foi apenas composto pelo caldo BHI e o óleo. As placas foram envolvidas em alumínio e incubadas por 48 horas a 37°C. em condições de microaerofilia. O ensaio foi realizado em triplicata em três momentos diferentes. Para melhor visualização de presença ou ausência do crescimento do microrganismo o ensaio foi revelado utilizando o corante cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio, que desenvolve uma cor vermelha na presença de crescimento/viabilidade dos microrganismos. A concentração mais baixa que não mostrar alteração na cor será considerada como CIM.

2.4.3.Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Para a determinação da CBM, após a leitura da CIM no teste de microdiluição em caldo, os poços que apresentaram ausência de crescimento foram repicados (1 µL) para placa contendo ágar *Brain Heart Infusion* (BHI), As placas foram incubadas a 37°C, por 48 horas em microaerofilia, em estufa bacteriológica. Os valores de CBM foram determinados como sendo a menor concentração na qual não houve crescimento bacteriano visível no ágar BHI.

2.5.Determinação de atividade antibiofilme

Um modelo de biofilme (GUGGENHEIM et al 2004) foi modificado para formar biofilme de *S.mutans* utilizando corpos de prova (CPS). Os mesmos foram confeccionados a partir de dentes incisivos bovinos nas medidas 5mm x 5mm x 1mm espessura. As medidas foram conferidas com um paquímetro digital (Jomarca®) e posteriormente foram autoclavados. Corpos de prova foram imersos em 1,5 ml de saliva artificial estéril por 30 minutos em placa de 24 poços para formação inicial da película. Após a formação inicial da película, os CP foram depositados em uma mistura de 100 ul de saliva artificial estéril e 300 ul de caldo BHI suplementado com 0,25% de sacarose, inoculado com 40 ul de *S. mutans*, sendo utilizado como controle positivo (meio de cultura, inóculo e CP). A placa de 24 poços contendo os CPs foi incubada a 37 c° por 24 horas em condições de microaerofilia.

Depois da inoculação por 24 horas, os poços foram lavados no mínimo 3 vezes com água destilada estéril para remover as células fracamente aderidas (células planctônicas), e os biofilmes pré formados na superfície dos CPs, foram tratados com OL nas concentrações 1xMIC, 2xMIC e 4xMIC por 6 horas. Foi realizado também

tratamento com a clorexidina 0,12% (Periogard[®] Colgate, Brasil.), a qual é considerado padrão ouro como colutório e comumente utilizado pela população.

2.5.1. Contagem de microrganismos viáveis

Para a análise da viabilidade bacteriana, os CPs foram retirados da placa de 24 poços, após realizado os tratamentos com OL e CHX 0,12%, transferidos imediatamente para microtubos (do tipo *ependorff*) contendo 1 mL de solução salina e mantidos em sonicador por 15 minutos (tempo determinado previamente em um teste piloto, dados não mostrados) para desprender as bactérias aderidas na superfície do esmalte. As amostras foram homogeneizadas em vórtex (3000 rpm) por 30 segundos e diluídas para 1:500 e 1:1000 em salina estéril. Alíquotas de 10 µl foram semeadas pelo método de espalhamento em ágar BHI. As placas de Petri foram incubadas em anaerobiose por 48h a 37°C e a contagem das colônias foi realizada após 48h de incubação. Os resultados foram expressos em porcentagem considerando o controle positivo como 100% de viabilidade (DE SOUZA et al 2017).

2.5.2. Microscopia de força atômica (MFA)

A análise tridimensional da estrutura do biofilme foi realizada por Microscopia de Força Atômica de acordo com a metodologia descrita por Arend e colaboradores (2016) com algumas modificações. Após o período experimental os dentes bovinos foram removidos e fixados com metanol absoluto durante 1 min (QUATRIN et al., 2015). A dispersão resultante foi colocada em pequenos pedaços quadrados de mica recém-cortada e fotografada. Os mapas topográficos foram registrados em um microscópio Park NX10 (Park Systems, Suwon - Coréia) equipado com um *software* SmartScan versão 1.0.RTM11a. As medições foram realizadas utilizando uma sonda TAP300G com frequência de ressonância nominal de 300 kHz e constante de força de 40 N / m. Todas as medições foram feitas em condições ambientais com temperatura ambiente de 21 ± 50C e umidade relativa de 55 ± 10% com taxa de varredura de 0,35 Hz. As imagens foram tratadas *offline* usando o *software* XEI versão 4.3.4Build22.RTM1.

2.6. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via, seguido pelo

teste de *Dunnett*. Os dados foram representados como a média \pm SEM. Foi utilizado o software *Graph Prism 6.01*. (*Graphpad Software, INC*). A análise microbiológica foi apresentada de forma percentual, com descrição de médias e desvio padrão. A formação de UFC de cada tratamento foi comparado a seu controle positivo e a clorexidina 0,12%.

3.RESULTADOS

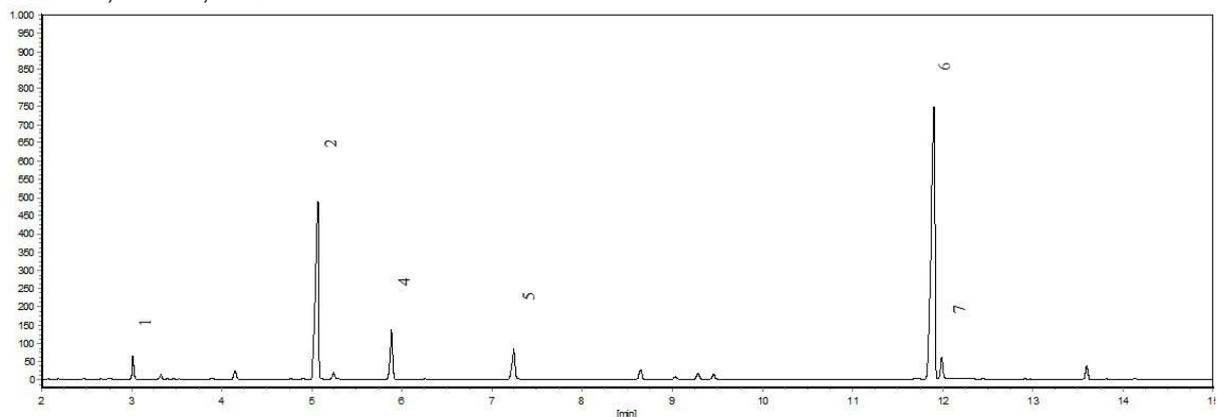
3.1 Avaliação cromatográfica do óleo de *T. vulgaris* (Caracterização físico-química)

Na tabela abaixo (tabela 1) estão descritos os principais componentes majoritários do óleo essencial utilizado segundo laudo técnico da empresa Ferquima.

Tabela 1: Principais componentes do óleo essencial estudado.

Nome comum	Nome científico (Família)	Componentes majoritários
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i> (Lamiaceae)	Timol (50%) p-cimeno (30%) linalol (6,05%) y-terpineno (6%) Carvacrol (5%) Mirceno (2%) α -pineno (2%)

Figura 5: Cromatograma do óleo essencial de *T. vulgaris* 1 – α -pineno; 2 – o-cimeno; 4 -y-terpineno; 5-linalol ,6-timol ; 7-carvacrol.

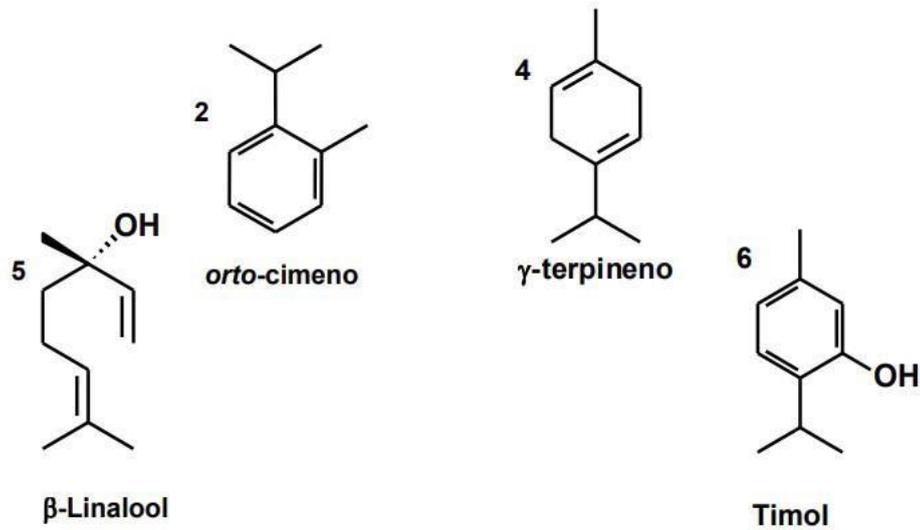


Fonte: autor

Tabela 2: Composição percentual do óleo essencial de *T.vulgaris*.

Pico	Substância	Porcentagem
1	α -pineno	2,36
2	o-cimeno	27,186
4	γ -terpineno	6,78
5	linalol	4,891
6	timol	47,40
7	carvacrol	2,50

Fonte: Autor

Figura 6: Estrutura química dos componentes majoritários do óleo essencial de *T.vulgaris*- – o-cimeno - γ -terpineno; -linalol ; -timol

Fonte: Próprio autor.

3.2. Atividade antimicrobiana

Os resultados obtidos com o teste de microdiluição em caldo, demonstraram que o óleo de *T. vulgaris*, apresenta atividade antimicrobiana em baixas concentrações frente à *S.mutans* ATCC 25175.

Tabela 3: Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo de *T. vulgaris*.

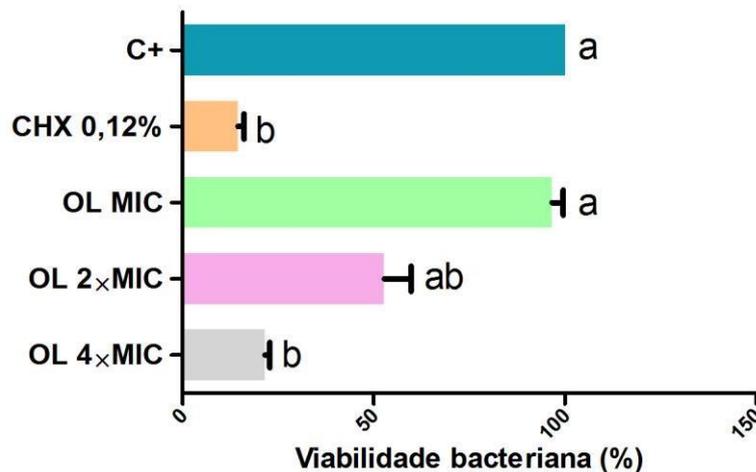
Microrganismo	CIM (mg/ml)	CBM (mg/ml)
<i>S.mutans</i> ATCC 25175	0,375 mg/mL	0,375 mg/mL

3.3. Atividade antibiofilme

3.3.1. Avaliação antimicrobiana das soluções testadas no biofilme

A avaliação da viabilidade celular está apresentada na figura 7. O controle positivo foi considerado com um crescimento de 100% das unidades formadoras de colônias (UFC). Os biofilmes tratados com a CHX reduziram o número de UFCs para 14%, OL 2xMIC para 52% e OL 4xMIC para 21% UFCs.

Figura 7: Contagens médias de formação de unidades formadoras de colônias (UFCs) nas diferentes soluções. Os resultados estão expressos em porcentagem (Média ± Erro padrão da média). C+: Controle Positivo (Solução NaCl 0,85%). CHX 0,12% - Clorexidina 0,12% OL MIC Óleo de *T. Vulgaris* 0,375 mg/mL, OL 2xMIC- Óleo de *T. Vulgaris* 0,75 mg/ML, OL 4xMIC- Óleo d *T. Vulgaris* 1,5 mg/mL. A análise estatística será realizada utilizando ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Dunnett. O dados serão representados como a média ± SEM. Será utilizado o software Graph Prism 6.01. a - Diferença significativa com relação ao controle positivo. b – Diferença significativa com relação a CHX 0,12%



3.3.2. Microscopia de força atômica

As imagens de MFA representadas nas figuras de 8 até 12 mostram a ação das soluções sobre a estrutura tridimensional do biofilme. Nas análises das imagens de MFA a estimativa aproximada das dimensões do biofilme variou entre 500 e 200 nm.

Figura 8: Análise da superfície do CP. Imagem obtida através de MFA demonstrando a presença do biofilme formado por *S mutans* - Controle positivo

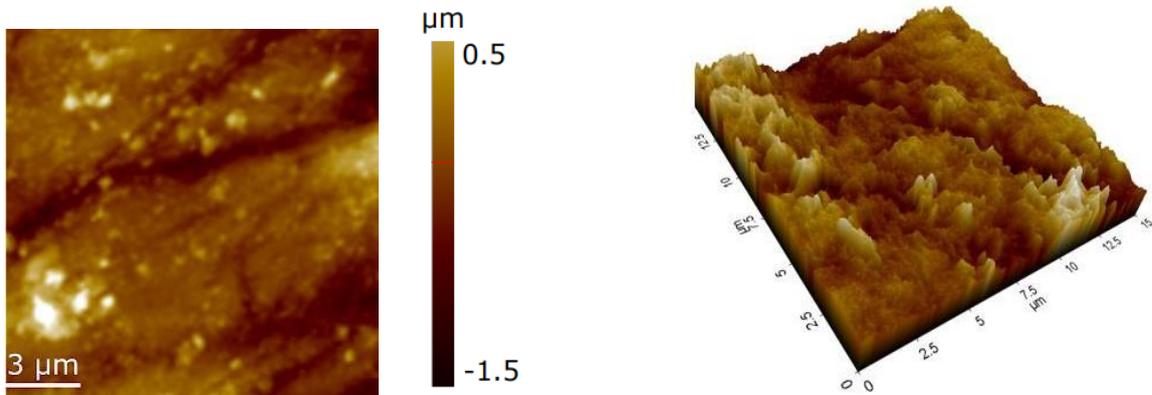


Figura 9: Análise da superfície do CP. Imagem obtida através de MFA demonstrando biofilme formado por *S. mutans* ao utilizar OL 1MIC.

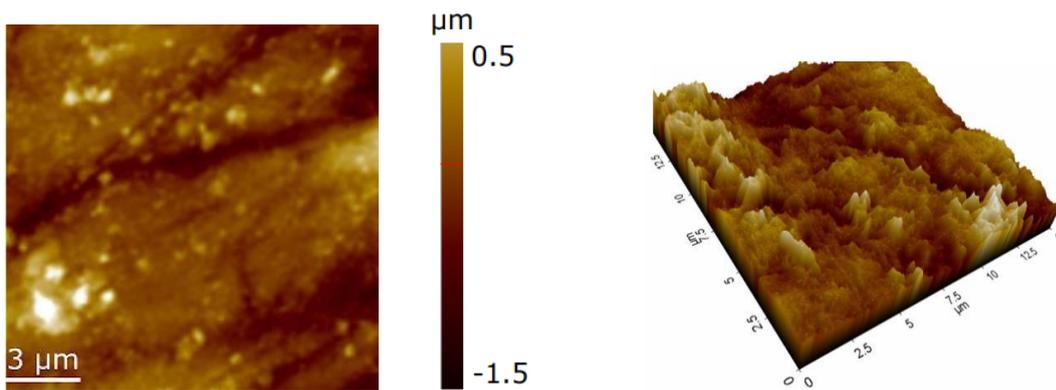


Figura 10: Análise da superfície do CP. Imagem obtida através de MFA demonstrando a redução do biofilme formado por *S. mutans* ao utilizar OL 2MIC, ao promover redução na sua amplitude.

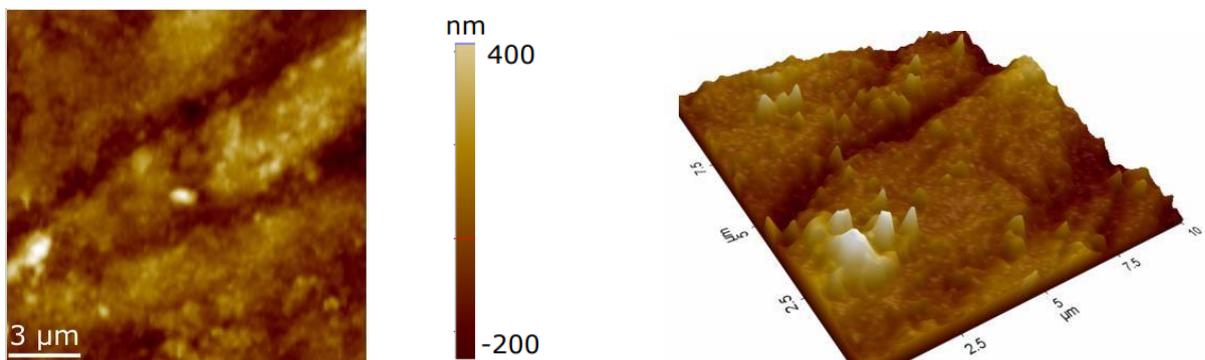


Figura 11: Análise da superfície do CP. Imagem obtida através de MFA demonstrando a redução do biofilme formado por *S. mutans* ao utilizar OL 4MIC.

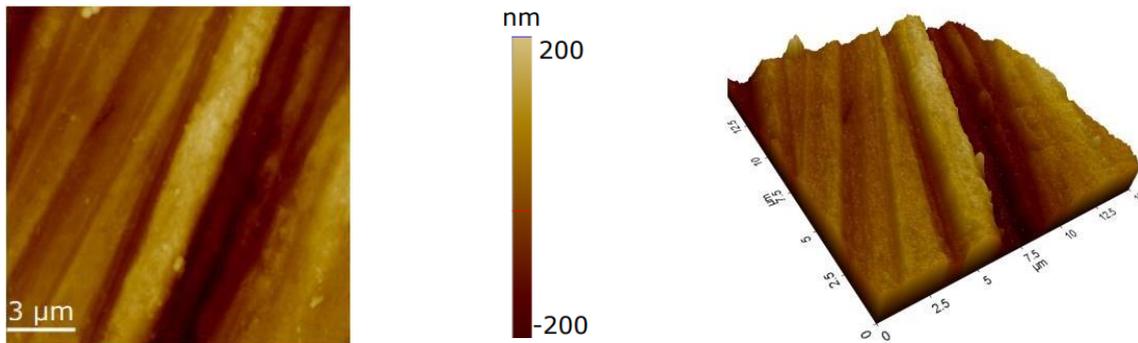
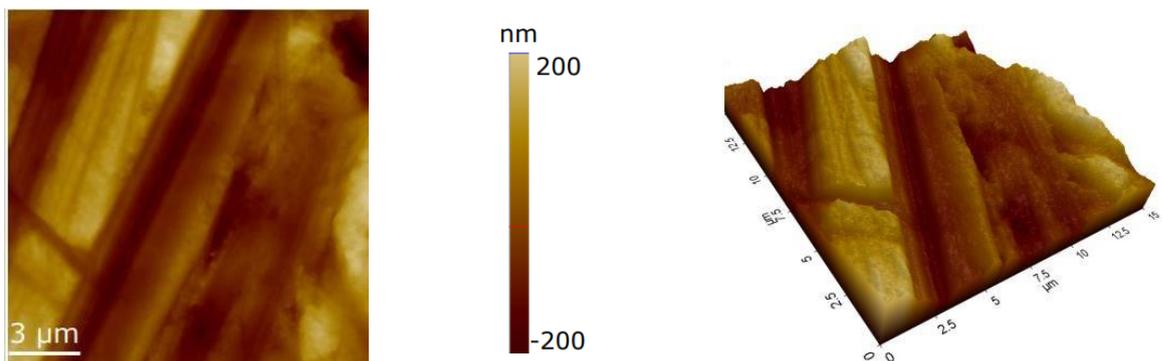


Figura 12: Análise da superfície do CP. Imagem obtida através de MFA demonstrando a redução do biofilme formado por *S. mutans* ao utilizar CHX 0,12%.



4.DISCUSSÃO

O óleo essencial de *T. vulgaris* apresentou os compostos timol (47,40%), o-cimeno (27,186%), linalol (4,891%), γ -terpineno (6,78%), carvacrol (2,50%) e α -pineno (2,366%) como componentes abundantes como mostra a figura 5, assim como reportado por Carvalho e colaboradores (2015), que identificaram os compostos timol (43,19%), p -cimeno (28,55%), γ -terpineno (6,36%), linalol (5,57%), carvacrol (3,14%) e α -pineno (2,60%) e Höferl e colaboradores (2009) que encontraram os compostos timol (43,4%), p -cimeno (23,5%) e o carvacrol (4,1%), como componentes majoritários.

Alguns autores relatam que as atividades biológicas de óleos essenciais estão relacionadas com a atividade dos componentes majoritários. De fato, diversos estudos

demonstraram que esses compostos apresentaram atividade quando testados separadamente, porém, essas atividades também podem ser atribuídas a possíveis interações entre todos os componentes (BASSOLÉ et al., 2010; HERMAN et al., 2016).

Desta forma, estudos que envolvem atividades antimicrobianas de produtos naturais devem conter, de preferência, as análises químicas das substâncias testes, pois assim se torna possível identificar os componentes majoritários e a associação com as atividades biológicas (SIMÕES et al, 2004).

Os resultados demonstraram significativo efeito antimicrobiano do óleo de *T. vulgaris* comparável a CHX, onde sua atividade antimicrobiana é atribuída principalmente ao carvacrol e timol, que atuam principalmente na parede celular, modificando sua permeabilidade e causando a perda de material celular, tais como ATP e ácido nucleico (TROMBETTA et al., 2005).

Na análise da viabilidade bacteriana a CHX apresentou resultados significativamente superiores ao OL 1xMIC e 2xMIC e muito próximo ao obtido com o OL 4xMIC. Isso se deve ao fato da sua natureza dicatiônica, a CHX 0,12% adsorve-se a compostos aniônicos como glicoproteínas salivares, radicais fosfatados e carboxílicos presentes na película dental e no biofilme dental como bactérias e polissacarídeos extracelulares (ADDY; MORAN, 1983) e apresenta capacidade de permanecer retida 12 horas, sendo liberada gradativamente. A CHX 0,12% é o padrão-ouro no controle do biofilme dental e inflamação gengival, sendo amplamente utilizada na Odontologia (VAN STRYDONCK et al., 2012). Por esta razão a CHX 0,12% foi utilizada como um dos tratamentos neste estudo para fins de comparação com OL. Apesar de ser bastante utilizada, uma das suas desvantagens é a possibilidade de manchar os dentes, um fator negativo principalmente por causa da estética bucal do paciente. Outra desvantagem é a possibilidade de alterações do paladar (LACHENMEIER, 2017). Também apresenta um sabor desagradável, descama a mucosa e pode causar reações alérgicas (KLUK et al, 2016).

Assim o uso de alternativas naturais, como extratos de plantas e ervas, vem ganhando uma maior aceitação no mercado odontológico e resultando em um crescente interesse em pesquisa para novas formulações.(KOTHIWALE et al., 2014).

O óleo de *T. Vulgaris* utilizado neste estudo, é rico nos compostos fenólicos timol e carvacrol, relacionados com muitas atividades biológicas como efeito antimicrobiano, antifúngico e anti-helmíntico (GUTIÉRREZ LARRAÍNZA et al., 2012).

O timol tem demonstrado efeitos antifúngicos, antibacterianos e anti-helmínticos, e o carvacrol tem sido estudado por seus efeitos bactericidas (SAKURAI et al., 2016), onde seu mecanismo de ação sobre os microrganismos se dá através do rompimento da membrana citoplasmática da parede das bactérias Gram negativas. Já o p-cimeno, outro constituinte, por ser uma substância hidrofóbica, gera um inchaço exacerbado da membrana citoplasmática, fragilizando-a (BARBOSA, 2010).

Nossos resultados corroboram estudos realizados *in vitro* como o de Ciandrini e colaboradores (2014) onde avaliaram os efeitos do carvacrol, composto presente no óleo essencial de tomilho, sobre biofilmes pré-formados de patógenos orais entre eles *S. mutans* ATCC 25175, onde concluíram que esse composto mostrou atividade antibiofilme contra o respectivo microrganismo. Outros estudos, como o De Oliveira Carvalho e colaboradores em 2020, demonstraram e confirmaram a atividade antibacteriana e antibiofilme do óleo de *T. vulgaris* contra *S. mutans*, onde concluíram que o óleo reduziu em 72% o biofilme em sua maior concentração (4MIC). Nikoli et al (2014) também realizaram testes antimicrobianos com óleo de três espécies do gênero *Thymus* para tratamento de feridas menores, distúrbios de cavidade oral, bem como a higiene bucal, justificando o uso do óleo para tais fins

Sugere-se então uma associação entre o OL de *T. vulgaris* e CHX 0,12%, afim de potencializar a ação antimicrobiana da mesma, diminuir seus efeitos colaterais em decorrência de poder usá-la em uma concentração menor, a exemplo de alguns produtos, dentre eles, vernizes bucais, que fazem uso da clorexidina e timol em associação, Estudos como o de Brailsford et al. (2003) e de Anand et al. (2012,) comprovaram que a combinação de clorexidina e timol na forma de verniz ao ser utilizada por um grupo de idosos, reduziu significativamente lesões cariosas bem como foi um importante coadjuvante no tratamento periodontal.

A Microscopia de Força Atômica evidenciou-se como uma eficiente técnica para caracterização qualitativa e quantitativa dos biofilmes, pois possibilita a visualização das superfícies em três dimensões (CAHILL; FREGER; KWAK, 2008).

As Fig.8 até a 12 mostram mapas de topografia 2D e 3D obtidos por Microscopia de Força Atômica (AFM) para substratos de dentes bovinos (CP) tratados com MIC (0,375 mg / mL), 2XMIC (0,75 mg/mL), 4XMIC (1,5mg/mL) e CHX 0.12%, submetidos ao processo antibiofilme. O controle positivo (figura 8) nas imagens 2D e 3D, mostra biofilme formado na matriz, evidenciado pela presença de matrizes poliméricas constituído por estruturas bacterianas crescidas com altura medida de 500

nm. Foram avaliadas por MFA as concentrações de MIC, 2XMIC, 4XMIC e CHX 0,12%. Na concentração de 2XMIC a altura do biofilme medido foi de 400 nm e na de 4XMIC (1,5mg/mL) a altura foi de 200 nm., semelhante ao tratamento com CHX 0,12%, demonstrando maior ação antibiofilme a concentração de 4XMIC, a qual apresentou menor amplitude do biofilme.

Os estudos *in vitro* são relevantes para estabelecer as interações bacterianas que ocorrem no biofilme, no entanto não simulam de uma forma exata as condições de desenvolvimento na boca, como por exemplo a diversidade de nutrientes, alterações de umidade, pH, temperatura, saliva e ainda a formação do biofilme polimicrobiano, o qual pode representar pelo menos 800 espécies.

5.CONCLUSÃO

Conclui-se com o presente estudo que o óleo essencial de *T.vulgaris* apresenta composição semelhante à encontrada na literatura em relação aos componentes majoritários. Possui atividade antimicrobiana e bactericida na concentração de 0,375 mg/mL frente à *S. mutans*, além de potencial atividade antibiofilme, a qual foi evidenciada através da contagem de colônias viáveis e da microscopia de força atômica. As imagens capturadas demonstraram a efetividade do OL 2XMIC (0,75 mg/mL) e 4XMIC (1,5mg/mL) na ação de destruição do biofilme sobre a superfície do CP, sendo considerado agente promissor para o emprego em produtos de higiene oral. Entretanto, estudos mais detalhados *in vitro* e *in vivo* bem como estudos de avaliação de toxicidade devem ser realizados visando uma possível aplicação profilática e/ou terapêutica

6.CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A habilidade em desenvolver biofilmes está relacionado diretamente com a capacidade do microrganismo em causar infecções e, como tal, deve ser motivo de preocupação na comunidade científica. Compreender os fatores genéticos e fisiológicos, associados a formação de biofilmes, contribui para a elucidação do potencial patológico apresentado por estes microrganismos.

A presente dissertação concentrou-se no estudo da eficácia do OL de *T.vulgaris* sobre biofilmes formados por *S.mutans*, principal causador da cárie dentária e de grande relevância clínica.

Entretanto ainda que os objetivos deste trabalho tenham sido alcançados sugere-se a curto e longo prazo:

- Avaliar o potencial antimicrobiano do OL sobre biofilme formado *in situ* utilizando um modelo de dispositivo intra oral, onde serão inseridos os CP.
- Avaliar a eficácia do OL frente aos biofilmes na forma de uma nanoestrutura.
- Realizar associação entre OL e a CHX 0,12%, para posterior avaliação do potencial antibiofilme e antimicrobiano .

7-REFERÊNCIAS

- [1]ADAMS, R.P. Identification of essential oils components by gas chromatography mass spectroscopy. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007. 804p
- [2]ADDY, M.; MORAN, J. Comparison of plaque accumulation after topical application and mouth rinsing with chlorhexidine gluconate. **Journal of clinical periodontology**, v. 10, p. 69–71, 1983.
- [3]ANDRADE, S.F.; CARDOSO, L.G.; BASTOS, J.K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplen ckiapopulnea*. **J Ethnopharmacol**, v. 109, n. 3, p. 464-471, 2007.
- [4]AREND, C. F. et al. Effect of etching with different hydrofluoric acid concentrations on bond strength between glazed feldspathic ceramic and metal brackets. **Brazilian Dental Science**, v. 19, n. 1, 2016.
- [5]ATABEK, D.; ALAÇAM, A.; CAKILCI, B.; BERKKAN, A. Um Estudo Comparativo de conter fluoreto de clorexidina e não-cloro-hexidina bochechos em um grupo adolescente. **Int Dent Res**, v. 2, p. 1-7, 2012
- [6]BARBOSA, L. N. (2010). Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como concervante em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação. Universidade Estadual Paulista, 5-107p.
- [7]BASSOLÉ, Imaël Henri Nestor et al. Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. **Molecules**, v. 15, n. 11, p. 7825-7839, 2010.
- [8]BONEZ, Pauline Cordenonsi et al. Sulfonamides complexed with metals as mycobacterial biofilms inhibitors. **Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases**, v. 23, p. 100217, 2021.
- [9]CARRETTO, C. de FP et al. Efeitos do chá de tomilho sobre a aderência in vitro de *Streptococcus mutans* ao esmalte dentário e *Candida albicans* à resina acrílica. **Rev Odontol UNESP**, v. 36, n. 3, p. 281-6, 2007
- [10]CARVALHO, R.J.; SOUZA, G.T.; HONÓRIO, V.G.; SOUSA, J.P.; CONCEIÇÃO,

- M.L.; MAGANANI, M.; SOUZA, E.L. Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. **Food Microbiol.**, v.52, p.59-65, 2015.
- [11]CIANDRINI, E.; CAMPANA, R.; FEDERICI, S. In vitro activity of Carvacrol against titanium-adherent oral biofilms and planktonic cultures. **Clin. Oral Invest.**, v.18, p.2001-2013, 2014.
- [12]CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts; approved standards, **CLSI document M27-A3**, 2018
- [13]DE OLIVEIRA CARVALHO, Isabela et al. In vitro anticariogenic and antibiofilm activities of toothpastes formulated with essential oils. **Archives of Oral Biology**, v. 117, p. 104834, 2020
- [14]DE OLIVEIRA, Jonatas Rafael et al. *Thymus vulgaris* L. extract has antimicrobial and anti-inflammatory effects in the absence of cytotoxicity and genotoxicity. **Archives of oral biology**, v. 82, p. 271-279, 2017
- [15]DE SOUZA, Marcia Ebling et al. Atividade antimicrobiana de nanopartículas de *Melaleuca alternifolia* em biofilme polimicrobiano in situ. **Patogênese microbiana** , v. 113, p. 432-437, 2017
- [16]GUGGENHEIM B, Guggenheim M, Gm€ur R, Giertsen E. Thurnheer T. 2004. Application of the Z€urich biofilm model to problems of cariology. *Caries Res.* 38:212–222. doi:10.1159/000077757
- [17]GUTIÉRREZ-LARRAÍNZA, M., Rúa, J., Caro, I., de Castro, C., de Arriaga, D., García Armesto, M. R., & del Valle, P. (2012). Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Food Control*, 26(2), 555–563.
- [18]HERMAN, A.; TAMBOR, K.; HERMAN, A. Linalool affects the antimicrobial efficacy of essential oils, *Curr. Microbiol.*, v.72, p.165-172, 2016.
- [19]HÖFERL, M.; BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L.; SCHMIDT, E., STOYANOVA, A., DENKOVA, Z.; SLAVCHEV, A.; GEISLER, M. Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. *J. Essent. Oil Res*, v.21, p.459-464, 2009.
- [20]MARSH, P. D. A placa dental um biofilme como microbiana. **Caries Res**, v. 38, p. 204-208, 2004
- [21]MIRANDA, C. A. S. F. et al. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Rev. Ciên. Agron.**, v. 47, n. 1, p. 213-220, 2016
- [22]QUATRIN, P. M. et al. Evaluation of different substrates for in vitro biofilmformation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciênciasda Saúde**, v. 16, n. 2, p. 191–203, 2015.
- [23]SAKURAI, Fernanda Naomi *et al.* Caracterização das propriedades funcionais das ervas aromáticas utilizadas em um hospital especializado em cardiopneumologia. **DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde**, v. 11, n. 4, p. 1097-1113, 2016.
- [24]SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ,

L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 1102 p., 2004. [

[25] SOLÓRZANO-SANTOS, Fortino; MIRANDA-NOVALES, Maria Guadalupe. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136-141, 2012.

[26] TEIXEIRA, João Paulo Feijão; MARQUES, Márcia Ortiz Mayo; PIO, Rose Mary. Caracterização dos óleos essenciais em frutos de nove genótipos de tangerina. **Citrus Research & Technology**, v. 35, n. 1, p. 1-10, 2017.

[27] TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MOZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.49, p.2474-2478, 2005.

[28] VAN STRYDONCK, D. A. C. et al. Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: A systematic review. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 39, n. 11, p. 1042–1055, 2012.

[29] VIEGAS, Marcelo Caldeira; BASSOLI, Denisley Gentil. Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-Innowax. **Química nova**, v. 30, n. 8, p. 2031-2034, 2007

5 DISCUSSÃO

O óleo essencial de *T. vulgaris* apresentou os compostos timol (48,43%), *o*-cimeno (27,186), linalol (4,891%), γ -terpineno (6,78%), carvacrol (2,50%) e α -pineno (2,366%) como componentes abundantes como mostra a figura 5, assim como reportado por Carvalho e colaboradores (2015), que identificaram os compostos timol (43,19%), *p*-cimeno (28,55%), γ -terpineno (6,36%), linalol (5,57%), carvacrol (3,14%) e α -pineno (2,60%) e Höferl e colaboradores (2009) que encontraram os compostos timol (43,4%), *p*-cimeno (23,5%) e o carvacrol (4,1%), como componentes majoritários.

Os resultados obtidos no estudo demonstraram significativo efeito antimicrobiano do óleo de *T. vulgaris* comparável a CHX, onde sua atividade antimicrobiana é atribuída principalmente ao carvacrol e timol, que atuam, principalmente na parede celular, modificando sua permeabilidade e causando a perda de material celular tais como ATP e ácido nucleico.(TROMBETTA et al.,2005).

Na análise da viabilidade bacteriana a CHX apresentou resultados significativamente superiores ao OL 1xMIC e 2xMIC e muito próximo ao obtido com o OL 4xMIC. Isso se deve ao fato da sua natureza dicatiônica, a CHX 0,12% adsorve-se a compostos aniônicos como glicoproteínas salivares, radicais fosfatados e carboxílicos presentes na película dental e no biofilme dental como bactérias e polissacarídeos extracelulares (ADDY; MORAN, 1983) e apresenta capacidade de permanecer retida 12 horas, sendo liberada gradativamente. A CHX 0,12% é o padrão-ouro no controle do biofilme dental e inflamação gengival, sendo amplamente utilizada na Odontologia (VAN STRYDONCK et al., 2012). Por esta razão a CHX 0,12% foi utilizada como um dos tratamentos neste estudo para fins de comparação com OL. Apesar de ser bastante utilizada, uma das suas desvantagens é a possibilidade de manchar os dentes, um fator negativo principalmente por causa da estética bucal do paciente. Outra desvantagem é a possibilidade de alterações do paladar (LACHENMEIER, 2017). Também apresenta um sabor desagradável, descama a mucosa e pode causar reações alérgicas (KLUK et al, 2016).

Assim o uso de alternativas naturais, como extratos de plantas e ervas, vem ganhando uma maior aceitação no mercado odontológico e resultando em um crescente interesse em pesquisa para novas formulações.(KOTHIWALE et al., 2014).

O óleo de *T. Vulgaris* utilizado neste estudo, é rico nos compostos fenólicos timol e carvacrol, relacionados com muitas atividades biológicas como efeito antimicrobiano, antifúngico e anti-helmíntico (GUTIÉRREZ LARRAÍNZA et al., 2012). O timol tem demonstrado efeitos antifúngicos, antibacterianos e anti-helmínticos, e o carvacrol tem sido estudado por seus efeitos bactericidas (SAKURAI et al., 2016), onde seu mecanismo de ação sobre os microrganismos se dá através do rompimento da membrana citoplasmática da parede das bactérias Gram negativas. Já o p-cimeno, outro constituinte, por ser uma substância hidrofóbica, gera um inchaço exacerbado da membrana citoplasmática, fragilizando-a (BARBOSA, 2010).

Nossos resultados corroboram estudos realizados *in vitro* como o de Ciandrini e colaboradores (2014) onde avaliaram os efeitos do carvacrol, composto presente no óleo essencial de tomilho, sobre biofilmes pré-formados de patógenos orais entre eles *S. mutans* ATCC 25175, onde concluíram que esse composto mostrou atividade antibiofilme contra o respectivo microrganismo. Outros estudos, como o De Oliveira Carvalho e colaboradores em 2020, demonstraram e confirmaram a atividade antibacteriana e antibiofilme do óleo de *T. vulgaris* contra *S. mutans*, onde concluíram que o óleo reduziu em 72% o biofilme em sua maior concentração (4MIC). Nikoli et al (2014) também realizaram testes antimicrobianos com óleo de três espécies do gênero *Thymus* para tratamento de feridas menores, distúrbios de cavidade oral, bem como a higiene bucal, justificando o uso do óleo para tais fins

Sugere-se então uma associação entre o OL de *T.vulgaris* e CHX 0,12%, afim de potencializar a ação antimicrobiana da mesma, diminuir seus efeitos colaterais em decorrência de poder usá-la em uma concentração menor, a exemplo de alguns produtos, dentre eles, vernizes bucais, que fazem uso da clorexidina e timol em associação, Estudos como o de Brailsford et al. (2003) e de Anand et al. (2012,) comprovaram que a combinação de clorexidina e timol na forma de verniz ao ser utilizada por um grupo de idosos, reduziu significativamente lesões cariosas bem como foi um importante coadjuvante no tratamento periodontal.

A Microscopia de Força Atômica evidenciou-se como uma eficiente técnica para caracterização qualitativa e quantitativa dos biofilmes, pois possibilita a visualização das superfícies em três dimensões (CAHILL; FREGER; KWAK, 2008).

As Fig.8 até a 12 mostram mapas de topografia 2D e 3D obtidos por Microscopia de Força Atômica (AFM) para substratos de dentes bovinos (CP) tratados com MIC (0,375 mg / mL), 2XMIC (0,75 mg/mL), 4XMIC (1,5mg/mL) e CHX 0.12%

, submetidos ao processo antibiofilme. O controle positivo (figura 8) nas imagens 2D e 3D, mostra biofilme formado na matriz, evidenciado pela presença de matrizes poliméricas constituído por estruturas bacterianas crescidas com altura medida de 500 nm. Foram avaliadas por MFA as concentrações de MIC, 2XMIC, 4XMIC e CHX 0,12%. Na concentração de 2XMIC a altura do biofilme medido foi de 400 nm e na de 4XMIC (1,5mg/mL) a altura foi de 200 nm., semelhante ao tratamento com CHX 0,12%, demonstrando maior ação antibiofilme a concentração de 4XMIC, a qual apresentou menor amplitude do biofilme.

Os estudos *in vitro* são relevantes para estabelecer as interações bacterianas que ocorrem no biofilme, no entanto não simulam de uma forma exata as condições de desenvolvimento na boca, como por exemplo a diversidade de nutrientes, alterações de umidade, pH, temperatura, saliva e ainda a formação do biofilme polimicrobiano, o qual pode representar pelo menos 800 espécies.

Na Odontologia, apesar do uso da fitoterapia ser milenar, a utilização de plantas medicinais para tratamento de doenças bucais é pouco explorada. Levando em conta a importância do controle do biofilme oral podemos sugerir que o óleo de *Thymus vulgaris* pode ser uma promissora estratégia de tratamento frente a *Streptococcus mutans*, principal microrganismo responsável pela formação da placa bacteriana.

6 CONCLUSÃO

Com os objetivos propostos neste estudo e os resultados experimentais obtidos, podemos concluir que:

- A composição do óleo utilizado é significativamente igual à encontrada na literatura, apresentando os mesmos componentes, em proporções relativas muito semelhantes;
- OL de *Thymus vulgaris* demonstrou atividade antimicrobiana e bactericida na concentração de 0,375 mg/mL frente a *S.mutans* (ATCC 25175);
- A partir das imagens capturadas através da microscopia de força atômica (MFA) foi observada a alta capacidade de formação de biofilme por *S. mutans* em superfície de dentes bovinos e, do mesmo modo demonstraram a efetividade do OL 2XMIC e 4XMIC na ação de destruição do biofilme sobre a superfície desse substrato

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A habilidade em desenvolver biofilmes está relacionado diretamente com a capacidade do microrganismo em causar infecções e, como tal, deve ser motivo de preocupação na comunidade científica. Compreender os fatores genéticos e fisiológicos, associados a formação de biofilmes, contribui para a elucidação do potencial patógeno apresentado por estes microrganismos.

A presente dissertação concentrou-se no estudo da eficácia do OL de *T.vulgaris* sobre biofilmes formados por *S.mutans*, principal causador da cárie dentária e de grande relevância clínica.

Entretanto ainda que os objetivos deste trabalho tenham sido alcançados sugere-se a curto e longo prazo:

- Avaliar o potencial antimicrobiano do OL sobre biofilme formado *in situ* utilizando um modelo de dispositivo intra oral, onde serão inseridos os CP.
- Avaliar a eficácia do OL frente aos biofilmes na forma de uma nanoestrutura.
- Realizar associação entre OL e a CHX 0,12%, para posterior avaliação do potencial antibiofilme e antimicrobiano .

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. Identification of essential oils components by gas chromatography mass spectroscopy. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007. 804p.
- ADDY, M.; MORAN, J. Comparison of plaque accumulation after topical application and mouth rinsing with chlorhexidine gluconate. **Journal of clinical periodontology**, v. 10, p. 69–71, 1983.
- ANDRADE, S.F.; CARDOSO, L.G.; BASTOS, J.K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplen ckiapopulnea*. **J Ethnopharmacol**, v. 109, n. 3, p. 464-471, 2007
- AREND, C. F. et al. Effect of etching with different hydrofluoric acid concentrations on bond strength between glazed feldspathic ceramic and metal brackets. **Brazilian Dental Science**, v. 19, n. 1, 2016
- ATABEK, D.; ALAÇAM, A.; ÇAKILCI, B.; BERKKAN, A. Um Estudo Comparativo de conter fluoreto de clorexidina e não-clorohexidina bochechos em um grupo adolescente. **Int Dent Res**, v. 2, p. 1-7, 2012
- BAKKALI, Fadil *et al.* Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BANAS, J. A.; VICKERMAN, M. M. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 14, n. 2, p. 89-99, 2003..
- BARBOSA, L. N. (2010). Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação. Universidade Estadual Paulista, 5-107p.
- BARRAT GM. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharma. Sci. Technol.** Today, 5(1), 163-171, 2000.
- BASSOLÉ, Imaël Henri Nestor *et al.* Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. **Molecules**, v. 15, n. 11, p. 7825-7839, 2010.
- BATTINO, M. *et al.* The antioxidant capacity of saliva. **Journal of Clinical Periodontology: Review article**, v. 29, n. 3, p. 189-194, 2002.
- BEHLAU, I.; GILMORE, M. S. Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease. **Archives of ophthalmology**, v. 126, n. 11, p. 1572–1581, 2008.
- BERWICK, A. **Aromaterapia holística: O equilíbrio entre o corpo e o espírito através dos óleos essenciais**. Rio de Janeiro, 1996. 270 p.
- BHATTI, Haq Nawaz *et al.* Biotransformation of monoterpenoids and their antimicrobial activities. **Phytomedicine**, v. 21, n. 12, p. 1597-1626, 2014.
- BINNING, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. Atomic force microscopy. **Physical Review**

Letters, v.56, p.930–933, 1986.

BONEZ, Pauline Cordenonsi et al. Sulfonamides complexed with metals as mycobacterial biofilms inhibitors. **Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases**, v. 23, p. 100217, 2021.

BREMER, P. J.; GEESEY, G. G.; DRAKE, B. Atomic force microscopy examination of the topography of a hydrated bacterial biofilm on a copper surface. **Current Microbiology**. v.24: p.223–230, 1992

CAIXETA, D.S. Sanificantes Químicos No Controle De Biofilmes Formados Por Duas Espécies De Pseudomonas Em Superfície De Aço Inoxidável. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – **Universidade Federal de Lavras, Lavras**, 2008.

CARRETTO, C. de FP *et al.* Efeitos do chá de tomilho sobre a aderência in vitro de *Streptococcus mutans* ao esmalte dentário e *Candida albicans* à resina acrílica. **Rev Odontol UNESP**, v. 36, n. 3, p. 281-6, 2007.

CIANDRINI, Eleonora et al. In vitro activity of Carvacrol against titanium-adherent oral biofilms and planktonic cultures. **Clinical oral investigations**, v. 18, n. 8, p. 2001-2013, 2014.

CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts; approved standards, **CLSI document M27-A3**, 2018

DE MOURA, Alexandre Carvalho; DA SILVA PINTO, Fabiana Gisele; MARASSI, Alisson Eduardo. Identificação e Caracterização de Microrganismos Isolados de Cárie Dental Humana. **Journal of Health Sciences**, v. 11, n. 4, 2009.

DE OLIVEIRA CARVALHO, Isabela et al. In vitro anticariogenic and antibiofilm activities of toothpastes formulated with essential oils. **Archives of Oral Biology**, v. 117, p. 104834, 2020.

DE OLIVEIRA, Jonatas Rafael et al. *Thymus vulgaris L.* extract has antimicrobial and anti-inflammatory effects in the absence of cytotoxicity and genotoxicity. **Archives of oral biology**, v. 82, p. 271-279, 2017.

DE SOUZA, Marcia Ebling et al. Atividade antimicrobiana de nanopartículas de *Melaleuca alternifolia* em biofilme polimicrobiano in situ. **Patogênese microbiana**, v. 113, p. 432-437, 2017.

DENKOVA, Z.; SLAVCHEV, A.; GEISLER, M. Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. *J. Essent. Oil Res*, v.21, p.459-464, 2009.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 15, p.167-193, Abr. 2002.

DONLAN, Rodney M. Biofilms and device-associated infections. **Emerging infectious**

diseases, v. 7, n. 2, p. 277, 2001.

DROGE, Cornelia; JAYARAM, Jayanth; VICKERY, Shawnee K. The effects of internal versus external integration practices on time-based performance and overall firm performance. **Journal of operations management**, v. 22, n. 6, p. 557-573, 2004.

FANI, Mohammadmehdi; KOHANTEB, Jamshid. In vitro antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* essential oil against major oral pathogens. **Journal of evidence-based complementary & alternative medicine**, v. 22, n. 4, p. 660-666, 2017.

FIGUEIRA, Leandro Wagner et al. Curcuma longa L.(turmeric), Rosmarinusofficinalis L.(rosemary), and *Thymus vulgaris* L.(thyme) extracts aid murine macrophages (RAW 264.7) to fight Streptococcus mutans during in vitro infection. **Archives of Microbiology**, p. 1-9, 2020.

GARCÍA, Omar et al. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay: results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 556, n. 1-2, p. 25-34, 2004.

GONÇALVES, G. M. S.; BOTTARO, M.; NILSON, A. C. Effect of the *Thymus vulgaris* essential oil on the growth of Streptococcus mutans. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 3, 2011.

GOREE, J. *et al.* Killing of *S. mutans* bacteria using a plasma needle at atmospheric pressure. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 34, n. 4, p. 1317-1324, 2006.

GUGGENHEIM B, Guggenheim M, Gm€ur R, Giertsen E. Thurnheer T. 2004. Application of the Z€urich biofilm model to problems of cariology. *Caries Res.* 38:212–222. doi:10.1159/000077757

GUNSOLLEY, John C. Eficácia clínica de enxaguatórios bucais antimicrobianos. **Journal of dentistry** , v. 38, p. S6-S10, 2010.

GUTIÉRREZ-LARRAÍNZA, M., Rúa, J., Caro, I., de Castro, C., de Arriaga, D., García Armesto, M. R., & del Valle, P. (2012). Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Food Control*, 26(2), 555–563.

HANS, Veenu Madaan *et al.* Antimicrobial efficacy of various essential oils at varying concentrations against periopathogen *Porphyromonas gingivalis*. **Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR**, v. 10, n. 9, p. ZC16, 2016.

HERMAN, A.; TAMBOR, K.; HERMAN, A. Linalool affects the antimicrobial efficacy of essential oils, *Curr. Microbiol.*, v.72, p.165-172, 2016.

HÖFERL, M.; BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L.; SCHMIDT, E., STOYANOVA, A., DENKOVA, Z.; SLAVCHEV, A.; GEISLER, M. Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. *J. Essent. Oil Res*, v.21, p.459-464, 2009.

KITSON F. G.; Larsen, B. S.; McEwen, C. N.; *Gas Chromatography and Mass*

Spectrometry - A Pratical Guide, Academic: London, 1996.

KNAAK, N.; FIUZA, L. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 5, n. 2, p. 120–132, 2010.

KOLENBRANDER, Paul E. *et al.* Oral multispecies biofilm development and the key role of cell–cell distance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 471-480, 2010.

LEMOS, José A.; BURNE, Robert A. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 154, n. Pt 11, p. 3247, 2008.

M.L.; MAGANANI, M.; SOUZA, E.L. Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. *Food Microbiol.*, v.52, p.59-65, 2015.

MARSH, P. D. A placa dental um biofilme como microbiana. **Caries Res**, v. 38, p. 204-208, 2004

MATTILA-SANDHOLM, Tiina; WIRTANEN, Gun. Biofilm formation in the industry: a review. **Food reviews international**, v. 8, n. 4, p. 573-603, 1992.

MAUNDERS, E.; WELCH, M. Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. **FEMS microbiology letters**, v. 364, n. 13, 2017.

MIRANDA, C. A. S. F. *et al.* Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Rev. Ciên. Agron.**, v. 47, n. 1, p. 213-220,2016

MONALISA J.; Swati M.; Swetalina J.; Sudhanshu S.; Nanotechnology- Future Prospect In Recent Medicine: A Review. **Int J Basic ClinPharmacol**. V.2 N.4 P.353-359, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". **Journal of Immunological Methods**. v. 65, v. 1–2, p. 55–63. 1983.

NASCIMENTO, Gislene GF *et al.* Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian journal of microbiology**, v. 31, n. 4, p. 247-256, 2000.

NIKOLIĆ, Miloš; GLAMOČLIJA, Jasmina; FERREIRA, Isabel C. F. R; CALHELHA, Ricardo C.; FERNANDES Ângela; MARKOVIĆ, Tatjana; MARKOVIĆ, Dejan; GIWELI, 136 Abdulhamed; SOKOVIĆ, Marina. Chemical composition, antimicrobial, antioxidante and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. And Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 183-190, 2014.

PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 1102 p., 2004.

PINHEIRO, Mayara Abreu et al. Efeito antimicrobiano de tinturas de produtos naturais sobre bactérias da cárie dentária. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 25, n. 2, p. 197-201, 2012.

PORTE, Alexandre; GODOY, Ronoel Luiz de Oliveira. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 2, 2001.

QUATRIN, P. M. et al. Evaluation of different substrates for in vitro biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde**, v. 16, n. 2, p. 191–203, 2015.

RICARDO C.; FERNANDES Ângela; MARKOVIĆ, Tatjana; MARKOVIĆ, Dejan; GIWELI, 136 Abdulhamed; SOKOVIĆ, Marina. Chemical composition, antimicrobial, antioxidante and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. And Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 183-190, 2014.

SADERI, Horieh et al. Antimicrobial effects of chamomile extract and essential oil on clinically isolated *Porphyromonas gingivalis* from periodontitis. In: **III WOCMAP Congress on Medicinal and Aromatic Plants-Volume 6: Traditional Medicine and Nutraceuticals 680**. 2003. p. 145-146.

SAKURAI, Fernanda Naomi et al. Caracterização das propriedades funcionais das ervas aromáticas utilizadas em um hospital especializado em cardiopneumologia. **DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde**, v. 11, n. 4, p. 1097-1113, 2016.

SALDANHA Juliana Tinoco; Gomes, Débora Leandro Rama. Emprego de nanopartículas em estratégias de prevenção e tratamento de infecções relacionadas à formação de biofilmes bacterianos. **Saúde. Com-ciência** issn: 2594-5890, v. 1, n. 1, 2014.

SALDANHA, J.T.; Emprego de nanopartículas em estratégias de prevenção e tratamento de infecções relacionadas à formação de biofilmes bacterianos. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Set. 2013.

SCHAFFAZICK, Scheila Rezende et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCULEAN, Anton et al. Periodontal treatment with an Er: YAG laser compared to ultrasonic instrumentation: a pilot study. **Journal of periodontology**, v. 75, n. 7, p. 966-973, 2004.

SELWITZ, Robert H.; ISMAIL, Amid I.; PITTS, Nigel B. Dental caries. **The Lancet**, v. 369, n. 9555, p. 51-59, 2007.

SENEVIRATNE, C. Jayampath et al. Unraveling the resistance of microbial biofilms: has proteomics been helpful?. **Proteomics**, v. 12, n. 4-5, p. 651-665, 2012.

SENEVIRATNE, C. Jñ et al. Architectural analysis, viability assessment and growth

kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. **Archives of oral biology**, v. 54, n. 11, p. 1052-1060, 2009.

SHANMUGAM, K. T. et al. Dental caries vaccine—a possible option?. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 7, n. 6, p. 1250, 2013.

SHEEN, S.; OWENS, J.; ADDY, M. The effect of toothpaste on the propensity of chlorhexidine and cetyl pyridinium chloride to produce staining in vitro: a possible predictor of inactivation. **Journal of clinical periodontology**, v. 28, n. 1, p. 46-51, 2001.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 1102 p., 2004.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al. Farmacognosia da planta ao medicamento. 5ª edição. **Porto Alegre, RS: Editora UFSC**, 2007.

SOLÓRZANO-SANTOS, Fortino; MIRANDA-NOVALES, Maria Guadalupe. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136-141, 2012.

SOUZA, M. E. et al. Melaleuca alternifolia nanoparticles against *Candida* species biofilms. **Microbial pathogenesis**, v. 104, p. 125-132, 2017.

STEPANOVIĆ, Srdjan *et al.* Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Apmis**, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.

SULISTYANI, Herastuti *et al.* Effect of roselle calyx extract on in vitro viability and biofilm formation ability of oral pathogenic bacteria. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 9, n. 2, p. 119-124, 2016.

TEIXEIRA, João Paulo Feijão; MARQUES, Márcia Ortiz Mayo; PIO, Rose Mary. Caracterização dos óleos essenciais em frutos de nove genótipos de tangerina. **Citrus Research & Technology**, v. 35, n. 1, p. 1-10, 2017.

THEIN, Z. M. *et al.* Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. **Mycoses**, v. 52, n. 6, p. 467-475, 2009.

TRIFAN, Adriana *et al.* Recent advances in tackling microbial multidrug resistance with essential oils: combinatorial and nano-based strategies. **Critical Reviews in Microbiology**, p. 1-20, 2020

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MOZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.49, p.2474-2478, 2005.

VAN STRYDONCK, D. A. C. et al. Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: A systematic review. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 39, n. 11, p. 1042–1055, 2012.

VIGAN, Martine. Essential oils: renewal of interest and toxicity. **European Journal of Dermatology**, v. 20, n. 6, p. 685-692, 2010.

VOS T, Allen C, Arora M et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet** 388(10053), 1545–1602 (2016).

WHO. Sugars and dental caries (2017).

<http://www.who.int/nutrition/publications/nutrientrequirements/sugars-dental-caries-keyfacts/en/>