



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

PRISCILLA GUIMARÃES SILVA

**INIBIÇÃO *IN VITRO* DE BIOFILME MULTIESPÉCIE DA CAVIDADE ORAL
COM O ÓLEO ESSENCIAL DE *Syzygium aromaticum***

CAMPINA GRANDE

2019

PRISCILLA GUIMARÃES SILVA

Linha de pesquisa: Estudo das terapias complementares em odontologia

**INIBIÇÃO *IN VITRO* DE BIOFILME MULTIESPÉCIE DA CAVIDADE ORAL
COM O ÓLEO ESSENCIAL DE *Syzygium aromaticum***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Edja Maria Melo de Brito Costa

CAMPINA GRANDE

2019

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S586i Silva, Priscilla Guimarães.
Inibição in vitro de biofilme multiespécie da cavidade oral com o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* [manuscrito] / Priscilla Guimarães Silva. - 2019.
60 p. : il. colorido.
Digitado.
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2019.
"Orientação : Profa. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa, Departamento de Odontologia - CCBS."
1. Microbiota oral. 2. Biofilmes. 3. Cravo-da-índia. 4. Atividade antimicrobiana. I. Título

21. ed. CDD 617.6

PRISCILLA GUIMARÃES SILVA

**INIBIÇÃO *IN VITRO* DE BIOFILME MULTIESPÉCIE DA CAVIDADE ORAL
COM O ÓLEO ESSENCIAL DE *Syzygium aromaticum***

**Dissertação apresentada ao programa
de Pós-Graduação em Odontologia da
Universidade Estadual da Paraíba como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Odontologia.**

APROVADA EM: 03/06/2019

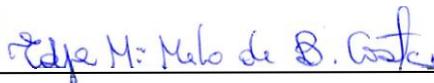
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos/ UFRJ
(Examinador externo)



Profª. Dra. Jozinete Vieira Pereira / UEPB
(Examinador interno)



Profª Drª Edja Maria Melo de Brito Costa / UEPB
(Membro titular / Orientadora)

À minha família, em especial meus pais Vanizia e Amarildo, pelo apoio incondicional.

À minha orientadora, Edja Costa, pela confiança e por sempre encorajar meu crescimento.

A vocês dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado e protegido durante toda minha vida, pois sempre confiei meus passos à sua vontade. À nossa senhora, intercessora, que no seu silêncio me fortalece por seu exemplo.

À minha orientadora Edja Costa, a qual serei eternamente grata por todo o ensinamento, por ter sido um exemplo tão forte de profissional e de mulher, sempre cativante e cheia de vida, foi um verdadeiro presente que a universidade me concedeu. Agradeço de forma verdadeira e singela pelas orientações, pela confiança e tempo dedicados ao meu crescimento.

A minha família, em especial aos meus pais, Amarildo Pedro da Silva e Vanízia Guimarães Silva, por todo esforço, pelo amor e suporte incondicional, eles que sempre acreditaram no meu potencial e aos quais dedico minha eterna gratidão.

Aos meus avós, pelo cuidado, pelas palavras de carinho e incentivo, pelo amor simples de doação pura. Aos meus tios, em especial a minha tia Valdenia Guimarães, por todo apoio e incentivo.

Ao meu namorado, Adbys Vasconcelos, por todo apoio e incentivo de sua parte, por ter sido um verdadeiro porto seguro no qual sei que posso contar. Por acreditar e me fazer crer que sou capaz, a você minha mais sincera gratidão.

Ao querido grupo de pesquisa, pelo apoio e pela grata oportunidade de conhecer e conviver com todos vocês, agradeço em especial à Carolina Medeiros por ter me acolhido, por todo aprendizado, ajuda, dedicação, disponibilidade e carinho. Aos colegas da turma de mestrado, pelo companheirismo construído ao longo destes dois anos, tenho certeza que um futuro ímpar está aguardando cada um de vocês.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO) da Universidade Estadual da Paraíba, pela dedicação e empenho em incentivar à pesquisa, agradeço a oportunidade de crescimento intelectual e profissional. Aos professores e colaboradores por todo incentivo e pela disponibilidade em compartilhar o conhecimento com dedicação, competência e respeito.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

RESUMO

A cavidade oral é um importante sítio no tocante a complexidade e diversidade de sua microbiota anfiótica e a coadesão destes microrganismos, facilita a formação de biofilmes, com destaque para os biofilmes multiespécie, os quais são associados a infecções prevalentes que acometem a cavidade oral. O que incentiva a busca de compostos que tenham boa ação antimicrobiana, com amplo espectro de ação. Este estudo objetiva avaliar, *in vitro*, a atividade inibitória do óleo essencial da *Syzygium aromaticum* frente a formação de um biofilme multiespécie, oriundo da cavidade oral. O óleo essencial foi caracterizado segundo o seu perfil fitoquímico através de Cromatografia Gasosa acoplada à um Espectrômetro de Massas e foi avaliado a sua atividade antioxidante pelo método de captura do radical livre DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl). A atividade antimicrobiana do óleo essencial foi inicialmente avaliada frente a cepas de bactérias e espécies de *Candida*, sendo determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM), bactericida mínima (CBM) e fungicida mínima (CFM) através da técnica de microdiluição em caldo, em seguida foi determinada a ação do óleo essencial frente à cinética de crescimento de espécies de *Candida*. A atividade antibiofilme foi avaliada à partir do biofilme formado com saliva humana previamente coletada de doadores, foram analisadas a morfologia do biofilme por microscopia de fluorescência, a viabilidade do biofilme pela contagem de UFC/mL e a atividade metabólica pelo ensaio de redução de XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide). O óleo essencial apresentou como composto majoritário o eugenol (74,54%) e demonstrou atividade antioxidante considerada como forte no primeiro tempo avaliado (45 minutos). Apresentou também atividade antimicrobiana frente à todas as espécies de *Candida* (CIM 500-1000 µg/mL, CFM 1000-2000µg/mL) e bactérias (CIM 2000 µg/mL, CFM > 2000 µg/mL). Na avaliação da cinética de crescimento o óleo essencial nas concentrações 2000 µg/mL e 1000 µg/mL apresentaram resultados similares ao controle positivo (Nistatina) a partir dos períodos de 2 horas e 4 horas, respectivamente. Na análise morfológica do biofilme observou-se, para ambas as concentrações testadas de *S. aromaticum* um menor número de estruturas, as quais aparecem fragmentadas e amorfas e a atividade antibiofilme foi comprovada pela diminuição significativa do número de UFC/mL quando comparado com o controle negativo, assim como a redução de 91,40% (2000 µg/mL) e de 92,19% (4000 µg/mL) da atividade metabólica do biofilme, sem diferença estatística entre as concentrações avaliadas e o controle positivo do teste (Clorexidina). O óleo essencial da *Syzygium aromaticum* inibe formação do biofilme, sem diferença do controle positivo. Tem como composto majoritário o eugenol, apresenta expressiva atividade antioxidante, antifúngica, com indução da cinética de crescimento celular similar ao padrão ouro.

DESCRITORES: Microbiota oral, Biofilmes, cravo-da-índia, atividade antimicrobiana

ABSTRACT

The oral cavity is an important site regarding the complexity and diversity of its amphibiotic microbiota and the co-adhesion of these microorganisms facilitates the formation of biofilms, especially multispecies biofilms, which are associated with prevalent infections that affect the oral cavity. Therefore, the search for compounds that have good antimicrobial action, with broad spectrum of action is encouraged. The aim of this study was to evaluate, *in vitro*, the inhibitory activity of *Syzygium aromaticum* essential oil against the formation of a multispecies biofilm from the oral cavity. The essential oil was characterized according to its phytochemical profile by Gas Chromatography coupled to a Mass Spectrometer and its antioxidant activity was evaluated by the DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl) reduction assay. The antimicrobial activity of the essential oil was initially evaluated against strains of *Candida* and species of bacteria to establish the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), minimum bactericide (MBC) and minimum fungicide (MFC) using the broth microdilution assay, then it was determined the influence of the essential oil on the growth kinetics of *Candida* species. A biofilm formed with human saliva was used to establish antibiofilm activity, biofilm morphology by fluorescence microscopy, biofilm viability by CFU / mL count and metabolic activity by XTT reduction assay (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide). The major compound of *S. aromaticum* essential oil was eugenol (74.54%) and it showed strong antioxidant activity in the first time evaluated (45 minutes). It also showed antimicrobial activity against all *Candida* species (MIC 500-1000 µg/mL, MFC 1000-2000 µg/mL) and bacteria (MIC 2000 µg/mL, MFC > 2000 µg / mL). The growth kinetics evaluation showed that concentrations 2000 µg / mL (from 2 hours) and 1000 µg/mL (from 4 hours) of the essential oil presented similar results to the positive control (Nystatin). In the morphological analysis of the biofilm it was observed, for both tested concentrations of *S. aromaticum* a smaller number of structures, which appear fragmented and amorphous, additionally the antibiofilm activity was confirmed by the significant reduction of the number of UFC/ mL when compared to the control and the reduction in biofilm metabolic activity 91.40% (2000 µg/mL) and 92.19% (4000 µg/mL), with no statistical difference between the concentrations evaluated and the positive control of the test (Chlorhexidine). *Syzygium aromaticum* essential oil inhibits biofilm formation, with no difference from positive control. Its major compound is eugenol, it has expressive antioxidant and antifungal activity, with action on cell growth kinetics similar to the gold standard.

KEY WORDS: Oral microbiota, Biofilms, *Syzygium*, Antimicrobial activity

LISTA DE SIGLAS

AA%	Porcentagem da Atividade Antioxidante
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CG	Cromatógrafo Gasoso
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMSO	Dimetilsufóxido
DPPH	2,2 Diphenyl-1-Picrylhydrazyl
EM	Espectrômetro de Massas
EROS	Espécies Reativas do Oxigênio
IAA	Índice de Atividade Antioxidante
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
XTT	(2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2h-Tetrazolium-5-Carboxanilide)

LISTA DE IMAGENS

Figura 1: Efeito do óleo essencial da *S. aromaticum*, nas concentrações de 1000 µg/mL e 2000 µg/mL, e do controle positivo (nistatina), sob a cinética do crescimento da *C. albicans* - ATCC 10231.

Figura 2: Efeito do óleo essencial da *S. aromaticum*, nas concentrações de 1000 µg/mL e 2000 µg/mL, e do controle positivo (nistatina), sob a cinética do crescimento da *C. albicans* - ATCC 60193.

Figura 3: Efeito do óleo essencial da *S. aromaticum*, nas concentrações de 1000 µg/mL e 2000 µg/mL, e do controle positivo (nistatina), sob a cinética do crescimento da *C. albicans* cepa clínica A1.

Figura 4: Efeito do óleo essencial da *S. aromaticum*, nas concentrações de 1000 µg/mL e 2000 µg/mL, e do controle positivo (nistatina), sob a cinética do crescimento da *C. albicans* cepa clínica A5.

Figura 5: Quantidade de UFC/mL do biofilme multiespécie após o tratamento com o óleo essencial da *S. aromaticum* (2000 µg/mL e 4000 µg/mL) e com o controle positivo (clorexidina) das espécies de microrganismo: *C. albicans* (Figura 5A), *C. tropicalis* (Figura 5B), *Streptococcus* spp. (Figura 5C), *Staphylococcus* spp (Figura 5D) e *S. mutans* (Figura 5E).

Figura 6: Imagens representativas da morfologia do biofilme multiespécie desenvolvido a partir da saliva de pacientes com candidose oral e tratado com óleo essencial da *S. aromaticum* nas concentrações 2000 µg/ml (Figura 6B) e 4000 µg/mL (Figura 6C), corado com calcofluor White. As imagens mostram o aspecto morfológico do controle positivo (clorexidina) (6D) e do controle negativo. No controle negativo (Figura 6A) as setas brancas evidenciam a presença de hifas. Todas as imagens foram feitas com a objetiva de 40x.

Figura 7: Valores de absorvância, à 490nm, obtidas na avaliação da atividade metabólica do biofilme pelo método do XTT.

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1: Compostos identificados no óleo essencial da *S. aromaticum*, por cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG-EM).

Tabela 2: Valores do Índice de atividade antioxidante (IAA) e da IC₅₀ calculados com base na concentração final do DPPH (31,6 µg/ml).

Tabela 3: Distribuição dos valores das Concentrações Inibitória Mínima (CIM), Fungicida Mínima (CFM) e Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial de *S. aromaticum*, de acordo com a espécie de *Candida* e bactéria.

Tabela 4: Porcentagem de redução da atividade metabólica do biofilme em relação ao controle negativo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 REPERCUSSÕES DO BIOFILME NA SAÚDE HUMANA	14
2.2 A MICROBIOTA ORAL E SUA ORGANIZAÇÃO EM BIOFILMES	16
2.3 <i>Syzygium aromaticum</i>	20
3 OBJETIVO	22
3.1 OBJETIVO GERAL	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4 METODOLOGIA	23
4.1 CARACTERIZAÇÃO E SEQUÊNCIA METODOLÓGICA DO ESTUDO	23
4.2 MATERIAL VEGETAL	24
4.2.1 Aquisição do material vegetal	24
4.2.2 Obtenção do óleo essencial	24
4.3 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA	24
4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	25
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	25
4.5.1 Microrganismos	26
4.5.2 Preparo de inóculo	26
4.5.2.1 Fungos	26
4.5.2.2 Bactérias	26
4.5.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Fungicida e Bactericida Mínima (CFM e CBM)	27
4.5.4 Cinética de crescimento	27
4.6 ANÁLISE EM BIOFILME MULTIESPÉCIE	28
4.6.1 Coleta da saliva	28
4.6.2 Análise da inibição do biofilme multiespécie	29
4.6.3 Análise morfológica do biofilme	29
4.6.4 Atividade metabólica do biofilme	30
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	30
5 RESULTADOS	31
5.1 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA	31
5.2 ANÁLISE ANTIOXIDANTE	31
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	32
5.4 ANÁLISE EM BIOFILME MULTIESPÉCIE	35
6 DISCUSSÃO	39

7	CONCLUSÃO	45
8	REFERENCIAS:	46

1 INTRODUÇÃO

Biofilmes orais são particularizados por sua complexa estrutura multiespécie (BURMOELLE et al, 2014) e ganham destaque por causar infecções polimicrobianas prevalentes, de abrangência local e/ou sistêmica (DEWHIRST et al, 2010; HOW et al, 2016, ZHANG et al, 2018). Os biofilmes são responsáveis por cerca de 65% das infecções humanas, incluindo aquelas que acometem a cavidade oral (SCOTT et al, 2007, DE LA FUENTE-NÚÑEZ et al, 2013), tais como a candidose (KLINGSPOR et al, 2015, SWIDERGALL, FILLER, 2017), doenças periodontais, como gengivite e periodontite (JONSSON et al, 2011, ROBERTS, DERVEAU, 2015, RUDICK et al, 2017) e a cárie dentária (PITTS et al, 2017, BOWEN, 2018).

A associação de microrganismos em biofilme multiespécie, formado principalmente pela coadesão dos mesmos, e a constituição de relações mutualísticas (KOLENBRANDER, 2011, DIAZ, 2012, KATHARIOS-LANWERMEYER et al, 2014, NOBBS, JENKISON, 2015) têm demonstrado um papel significativo na colonização, sobrevivência, dinâmica de infecção e na resistência microbiana frente à defesa do hospedeiro (WALL et al, 2019, WOLCOTT et al, 2013, DIAZ et al, 2014). Isto pode ser resultante da maior expressão dos fatores de virulência, favorecidos pela associação entre diferentes espécies dos microrganismos envolvidos (FALSETTA et al, 2014, WILLEMS, 2016, XU, 2016, HWANG et al, 2017, XU et al, 2017, KIM et al, 2017).

O desenvolvimento da resistência frente aos antimicrobianos (LUKASZUK et al, 2017, WANG et al, 2016), associado com a maior proteção promovida pela estrutura do biofilme, confere maior êxito aos patógenos e enaltece a correlação do biofilme com o processo saúde-doença (WALL et al, 2019, KALLIO et al, 2008, OLSEN, 2015, BANDARA et al 2016). Surge assim, o interesse pela busca de compostos que tenham boa ação antimicrobiana, com amplo espectro de ação, com poder de inibir principalmente os biofilmes multiespécies (JAFRI et al, 2018).

Nos últimos anos, constatam-se avanços nas pesquisas nessa área, com ênfase no desenvolvimentos de novos fármacos a partir de produtos naturais, especialmente, de plantas medicinais, com o intuito de respaldar cientificamente o uso desses componentes naturais na medicina tradicional, além de favorecer o desenvolvimento de

novos produtos de aplicação clínica, com ação terapêutica eficaz e de baixa toxicidade (BARBOSA et al, 2012, NEWMAN, CRAGG, 2016, CHINSEMBU, 2016).

Dentre as plantas utilizadas na medicina popular destaca-se a *Syzygium aromaticum*, utilizada pela população no tratamento da halitose e dor de dente (SANTOS et al, 2009), como analgésico e antimicrobiano (CHAIIEB et al, 2007) e para o tratamento de infecções cutâneas, orais e do trato geniturinário (KHAN, AHMAD, 2012, RODRIGUEZ et al, 2014). É conhecida popularmente por cravo, cravo-da-índia ou cravo-do-reino. (GHEDIRA et al, 2010).

A *S. aromaticum* possui ação antifúngica (PINTO et al, 2009, MANSOURI et al, 2014), antibacteriana (ISMAIL et al, 2017, BESRA, KUMAR, 2018), antibiofilme (KHAN, AHMAD, 2012, BUDRI et al, 2015), anti-inflamatória e analgésica (HALDER, 2011, HALDER et al, 2012, BACHIEGA et al, 2011), porém, ressalta-se a necessidade de estudos complementares para validá-la como uma fonte eficaz e segura de compostos ativos (PINTO et al, 2009, MANSOURIAN et al, 2014).

A limitação da literatura no tocante ao uso da *S. aromaticum* frente ao biofilme multiespécie (BUDZYNSKA et al, 2017), somado à inexistência de relatos sobre a sua atividade inibitória em um biofilme formado a partir de saliva *in natura* de pacientes com candidose, enaltecem a realização do presente estudo (RODER et al, 2016). O uso da saliva *in natura* para formação do biofilme aproxima o estudo das condições do ambiente de interesse (BAKER et al, 2017, RODER et al, 2016), a qual apesar de não possuir uma microbiota endógena, é uma rica fonte de microrganismos que derivam das superfícies orais, considerando assim o caráter multiespécie da microbiota oral (KILIAN et al, 2016, MARSH, ZAURA et al, 2017, SCHRODER et al, 2017, KRISHNAN et al, 2017).

Este estudo avaliou *in vitro* a atividade inibitória do óleo essencial da *Syzygium aromaticum* frente a formação de um biofilme multiespécie oriundo da cavidade oral, assim como, caracterizou a sua composição fitoquímica e a atividade antioxidante.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 REPERCUSSÕES DO BIOFILME NA SAÚDE HUMANA

A perda do equilíbrio homeostático entre o microrganismo e o hospedeiro leva ao desenvolvimento de diversas infecções que comprometem a saúde do indivíduo com abrangência local e/ou sistêmica (HOW et al, 2016). Este processo se dá principalmente pela formação de biofilmes, cuja organização é fundamental para elevar a patogenicidade e a resistência aos antimicrobianos (HOW et al, 2016, MACHADO *et al.* 2010). Os biofilmes são estruturas compostas por agregados de microrganismos embebidos em uma matriz extracelular, com capacidade de aderir a superfícies bióticas ou abióticas (HOBLEY et al, 2015, FLEMMING et al, 2016).

São diversos os fatores que podem romper com a condição de homeostase estabelecida entre os microrganismos da cavidade oral e o hospedeiro, como dieta, idade, comprometimento do sistema imunológico (MARSH, 2009, TAKAHASHI, NYVAD, 2011, ZAURA, TEM CATE, 2015, PITTS et al, 2017) e uso incorreto e demasiado de antimicrobianos (KUMAR et al, 2017). Esta mudança na condição homeostática leva a proliferação não modulada de espécies patogênicas, estabelecendo assim o processo de doença (HOW et al, 2016, ROBERTS, DARVEAU, 2015). Os biofilmes orais se destacam por causar infecções polimicrobianas prevalentes (DEWHIRST et al, 2010, HOW et al, 2016, SCHWIERTZ, 2016, BOWEN, 2018), como candidose (XU et al. 2014, KLINGSPLOR et al, 2015, SWIDERGALL, FILLER, 2017), doença periodontal (JONSSON et al, 2011, ROBERTS, DERVEAU, 2015, RUDICK et al, 2017) e cárie dentária (PITTS et al, 2017, BOWEN, 2018).

Dentre as infecções fúngicas que acometem o ser humano, destaca-se a candidose, que tem como fator etiológico as leveduras do gênero *Candida*, em especial a *Candida albicans*, a qual já foi isolada em cerca de 50% dos casos de candidose (KLINGSPOR et al, 2015, GARCIA-CUESTA et al, 2014). Consiste em uma micose mucocutânea de aspecto clínico variável, que acomete cerca de um milhão e meio de pessoas a nível mundial (KIM, 2016). Esta condição pode ser assintomática ou produzir alguns sintomas, como: alteração no paladar, ardor, sensação dolorosa e dificuldade de deglutição (HOSHI et al, 2011; BAKHSHI et al, 2012).

Nos últimos anos houve um aumento quantitativo de infecções fúngicas, principalmente nos indivíduos com deficiências imunológicas ou que apresentam outro

fator de risco, como, câncer e o uso de dispositivos invasivos, como cateteres, ou de drogas antibacterianas (SARDI et al., 2013, LALLA et al, 2010). Adicionalmente, constata-se que a apresentação mais agressiva da doença pode invadir tecidos mais profundos e acometer outros órgãos, evoluindo para sua forma sistêmica (SANTOS et al, 2013, JACOBSEN et al, 2012). Neste aspecto, as infecções sistêmicas causadas por fungos, em especial a *C. albicans*, presente em 40% à 50% dos casos (KULLBERG, ARENDRUP, 2015, PAPPAS et al, 2016), se torna uma das infecções invasivas mais comuns adquiridas em hospitais (BROWN et al, 2012, PFALLER, DIEKEMA , 2007), sendo diagnosticado em cerca de 1% a 2% dos internos (McCARTY, PAPPAS, 2016, CLEVELAND et al 2015) e podendo atingir níveis de mortalidade de 10% a 47% dos casos (McCARTY, PAPPAS 2016, KULLBERG,ARENDRUP,2015, STROLLO et al, 2016).

Uma vez que há o diagnóstico da candidose, faz-se necessário o emprego de agentes antifúngicos para seu tratamento, os quais, de forma geral, se enquadram em três classes, sendo elas: os azóis, os polienos e as equinocandinas (WONG et al, 2014), no entanto, espécies de *Candida* não-albicans costumam exibir susceptibilidade reduzida a esses antifúngicos (WALKER et al, 2013) e casos de resistência já foram constatados (LUKASZUK et al, 2017, WANG et al, 2016).

As doenças periodontais atingem 10% a 11% da população adulta à nível mundial (KASSEBAUM et al, 2014). Dentre estas, a gengivite é a mais prevalente em adultos. Representa uma condição inflamatória reversível, induzida pela presença do biofilme supragengival (JONSSON et al, 2011, IGIC et al, 2012). Se não tratada, a gengivite pode evoluir para uma periodontite, na qual o infiltrado inflamatório crônico, em resposta a presença do biofilme subgengival, induz a destruição dos tecidos de sustentação dos dentes, incluindo o ligamento periodontal (PIHLSTROM et al, 2005). Além de diferentes espécies de bactérias outros microrganismos como fungos, em especial a *C. albicans*, estão correlacionados com a severidade da periodontite crônica (CANABARRO et al, 2013).

O biofilme dentário também está associado à cárie dentária, condição multifatorial (PITTS et al, 2017, BOWEN, 2018) que acomete 35% da população à nível mundial (MARCENES et al, 2013) e 53,4% das crianças e 56,5% dos adolescentes à nível de Brasil (BRASIL, 2012). Microrganismos do gênero *Streptococcus* spp. são frequentemente identificados em lesões ativas de cárie (KOUIDHI et al, 2014, MOYNIHAN, KELLY, 2014; SIMON-SORO, MIRA, 2015,

TIAN et al., 2015), podendo estar associados a patógenos como a *C. albicans*, fato que comprova o caráter multiespécie desta condição (FRAGKOU et al, 2016, DE-LA-TORRE et al, 2016, LOZANO-MORAGA et al, 2017). Nesta relação, a *Candida* proporciona um papel estrutural para o biofilme multiespécie (CUI, 2013, BANERJEE et al, 2013), além de estimular, por exemplo, a proliferação do *Streptococcus mutans* e a modulação dos seus fatores de virulência (FALSETTA et al, 2014, KIM et al, 2017).

O controle do biofilme consiste em um importante aspecto para a prevenção da cárie dentária e da doença periodontal (CHAPPLE et al, 2017, LARSEN, FIEHN, 2017, MARSH et al, 2015). A remoção por agentes físicos, como a escovação (MARCHESAN et al, 2018, FERNANDES et al, 2018), ou pelo uso de agentes químicos, como os antimicrobianos, consistem em técnicas apropriadas na clínica odontológica (HERRERA et al, 2012). Dentre os antimicrobianos utilizados destaca-se a clorexidina, substância de uso frequente no controle e prevenção da formação de biofilme dentário (FIGUEIREDO et al, 2004, VARONI et al, 2012, ARABACI et al, 2013, VIANA et al, 2014). Porém, produz efeitos adversos, como pigmentações no esmalte dentário (DA COSTA et al, 2017) e lesões na mucosa (PLATINGA et al, 2016), além de resistência microbiana, fato que incentiva a busca por novos compostos (KAMPF, 2016).

O biofilme e sua relação com o processo saúde doença constitui um foco importante para a pesquisa atual, o avanço nos estudos deste cunho elucidou a complexa estrutura que envolve a microbiota oral particularizada por seu caráter multiespécie. Portanto, metodologias que avaliem a atividade antimicrobiana em biofilmes multiespécies devem ser priorizadas (EDLUND, 2013, EDLUND 2015, BAKER et al, 2017).

2.2 A MICROBIOTA ORAL E SUA ORGANIZAÇÃO EM BIOFILMES

A cavidade oral é colonizada por diversos microrganismos, constituindo um complexo ecossistema com cerca de 700 espécies identificadas, dentre as quais destacam-se fungos e bactérias (PASTER et al, 2006, DEWHIRST et al, 2010, BAKER et al, 2017), este é, portanto, um importante sítio no tocante a complexidade e diversidade de sua microbiota (WADE, 2013).

Dentre os microrganismos identificados, as bactérias ganham destaque por compor a maior proporção da microbiota oral (WADE, 2013). Segundo dados do

Human Oral Microbiome Database (HOMD) as bactérias encontradas no meio oral se enquadram em seis grandes filos, que abrangem 94% das bactérias identificadas, são eles: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes e Fusobacteria (SILVERMAN et al, 2010). Dentre os gêneros os mais prevalentes são: *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Haemophilus*, *Propionibacterium*, *Veillonella*, *Actinobacillus*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Porphyromonas* e *Treponema* (KOLENBRANDER et al, 2002, KOLENBRANDER, 2011, LI et al, 2013).

Os fungos representam cerca de 0,1% da microbiota quando comparado às bactérias. Apesar da baixa proporção, esses microrganismos constituem uma maior biomassa (DELHAES, 2012, CUI, 2013, SEED, 2015), além de possuírem fatores de virulência como a capacidade de diferenciação em hifas (dimorfismo), as quais podem aparecer como um mecanismo de fuga à resposta imune do hospedeiro (WILLIAMS, LEWIS, 2011, POLKE et al, 2015), dentre outros aspectos que reafirmam a relevância destas espécies (DIAZ et al, 2014, JANNUS, 2016). Atualmente é sabido que diversos fungos habitam a cavidade oral em indivíduos saudáveis, contabilizando cerca de 75 gêneros de fungos identificados, dentre eles os gêneros *Candida*, *Cladosporium*, *Aureobasidium* e *Aspergillus* (GHANNNOUM, 2010, DUPUY, 2014). O gênero *Candida*, em especial a *Candida albicans*, ganha destaque devido a sua patogenicidade no estabelecimento da candidose (KLINGSPOR et al, 2015).

É possível também identificar estes microrganismos na saliva, a qual apesar de não possuir uma microbiota endógena, é uma rica fonte de microrganismos que derivam das superfícies orais (COSTALONGA, HERZBERG, 2014, KILIAN et al, 2016, MARSH, ZAURA et al, 2017, SCHRODER et al, 2017, KRISHNAN et al, 2017). A saliva é um importante fator promotor para a sobrevivência dos microrganismos, tendo em vista que as proteínas salivares constituem uma película que permite a adesão destes às superfícies mucosas e de dentes, além de possuir constituintes que são fontes de nutrientes (COSTALONGA, HERZBERG, 2014). Por esse e outros fatores, a cavidade oral proporciona um ambiente favorável para a sobrevivência de microrganismos, que têm como habitat natural, especialmente, os dentes, sulco gengival e língua (SCHWIERTZ, 2016, BOWEN, 2018).

Em sua constituição normal, os microrganismos da cavidade oral coabitam de forma comensal, estabelecendo uma tênue relação de homeostase com o hospedeiro

(ZAURA, TEN CATE, 2015, BELSTROM, 2016). Constituindo a microbiota anfibiônica, a qual além de suas muitas outras funções, desempenha um papel significativo na proteção do hospedeiro contra microrganismos patogênicos. No entanto, quando ocorre quebra da condição de homeostase, podem causar infecções, geralmente, deflagradas pela formação de biofilme (D'ARGENIO, SALVATORE, 2015, PITTS et al, 2017, KUMAR et al, 2017).

Os biofilmes são estruturas com capacidade de aderir a superfícies bióticas constituindo um agregado de microrganismos embebidos em uma matriz extracelular (HOBLEY et al, 2015, FLEMMING et al, 2016). O primeiro estágio para a maturação do biofilme oral consiste na adesão a um substrato, propiciada pela película adquirida de saliva. A priori há o estabelecimento de uma interação não-específica e reversível entre o microrganismo e a superfície na qual ele está aderido (GARRETT et al, 2008, SIQUEIRA et al, 2012). Subsequentemente, ocorre a produção da matriz de substâncias extracelulares poliméricas, com formação de microcolônias, sucedendo-se a constituição do biofilme maduro (SUTHERLAND, 2001, CHANDRA et al, 2001).

A adesão entre microrganismos orais, conhecida como coadesão, é uma tendência natural de união célula-célula firmada entre microrganismos planctônicos a outros já aderidos às superfícies orais. Essa característica facilita a formação de biofilme multiespécie (KOLENBRANDER, 2011, KATHARIOS-LANWERMEYER et al, 2014), com efeito protetor ao estresse ambiental. Isto resulta em um maior grau de sucesso dos patógenos (JEFFERSON, 2004), que aumentam sua capacidade de colonização, crescimento e invasão, elevam seus fatores de virulência, aumentam a capacidade de interagir e compartilhar informações genéticas, se tornam mais resistentes a ação de antimicrobianos e à resposta imune (PETERS et al, 2012, WOLCOTT et al, 2013, WRIGHT et al. 2013, DIAZ et al, 2014, KRAGH et al, 2014). Fato que resulta na constatação da elevação dos índices de morbidade e mortalidade de pacientes acometidos por infecções nosocomiais causadas por biofilmes (PAMMI et al, 2014).

Na constituição do biofilme ocorre a instituição de relações mutualísticas (DIAZ, 2012, NOBBS, JENKISON, 2015), e uma particularidade importante é a interação entre os microrganismos através do *Quorum Sensing* (QS). Este mecanismo permite que pequenas moléculas estabeleçam um sistema de comunicação entre os microrganismos envolvidos no biofilme, e favoreçam positivamente a expressão de

genes e outros fatores que reafirmam a complexidade do mesmo. O QS pode ser patogênico de duas formas, controlando a expressão de fatores de virulência e pela toxicidade de suas moléculas para as células do hospedeiro (ALBUQUERQUE, CASADEVALL, 2012). Inicialmente, pensou-se que o QS era exclusivo de bactérias, no entanto, foi descoberto o farnesol, molécula que exerce a função de QS em fungos (HORNBY et al, 2001, ALBUQUERQUE, CASADEVALL, 2012).

A associação de fungos, em especial *C. albicans*, com bactérias pode exacerbar a patogenicidade do biofilme por diversos fatores. *Streptococcus oralis*, microrganismo comensal, possui a capacidade de elevar o grau de severidade da candidose oral ao elevar o nível de enzimas que degradam a E-caderina, propiciando a permeabilidade de *Candida* através da mucosa (DIAZ et al, 2014, XU, 2016). Também foi comprovado que *S. oralis* eleva a expressão do gene *EFG1* e do gene *ALSI*, que culminam na modulação de hifas filamentosas que elevam a patogenicidade de *Candida* além de promover a interação entre os microrganismos e crescimento do biofilme (XU et al, 2017). *Streptococcus gordonii* também está relacionado com o aumento dos fatores de patogenicidade de *C. albicans* quando associados em biofilme (BAMFORD et al. 2009; SHIRTLIFF et al. 2009; DIAZ, et al. 2012; RICKER et al. 2014)

C. albicans também pode estar associada ao *Streptococcus mutans*. Estudos comprovam que esses microrganismos associados em biofilme proliferam com maior intensidade, quando comparado ao seu cultivo isolado. Além disso, *C. albicans* ainda induz a exacerbação de fatores de virulência de *S. mutans* (FALSETTA et al, 2014, SZTAJER, 2014, WILLEMS et al, 2016, KIM et al, 2017). *C. albicans* pode também interagir em biofilmes com a presença de *Pseudomonas gingivalis* e espécies do gênero *Streptococcus*. Apesar de já constar relatos de supressão de *C. albicans* por *P. gingivalis* no tocante à influência no processo de transformação de levedura para hifas e na supressão da formação do biofilme (NAIR et al, 2001; THEIN et al, 2006; TAMAI et al, 2011), esse efeito não é observado em biofilmes de maior complexidade (CAVACANTI et al, 2014).

Biofilmes multiespécie também podem ocorrer por associações entre diferentes espécies bacterianas, como entre espécies do gênero *Actinomyces* e *Streptococcus* (CAVALCANTI et al, 2014, MATOS et al, 2017). Já é constatada a relevância de se estudar a associação de diferentes microrganismos na constituição de biofilmes multiespécie e sua repercussão na saúde humana, adicionalmente os dados disponíveis

destacam a necessidade de explorar a comunidade como um todo, e não mais espécies isoladas (RODER et al, 2016).

Testes *in vitro* constituem, portanto, uma etapa importante para examinar essas interações complexas sob condições controladas. Para tal é recomendável que o desenho do estudo considere a diversidade microbiológica e reproduções de condições do ambiente de estudo (RODER et al, 2016). Aproximando ao máximo as condições físico-químicas, microbiológicas e de nutrientes presentes no habitat natural. A constituição de biofilmes preferencialmente deve ser feita com material removido do ambiente de interesse, mantendo assim grande parte da complexidade e heterogeneidade da amostra original (McBAIN, MACFARLANE, 2001, McBAIN et al., 2003, HOPKINS et al., 2003).

A complexidade dos biofilmes multiespécie e sua correlação com o processo saúde doença, somado ao aumento da resistência dos microrganismos, leva a uma preocupação no âmbito da saúde pública (BANDARA et al 2016, SILVA et al, 2017, LUKASZUK et al, 2017, BOWEN, 2018). Portanto, novas alternativas terapêuticas que efetivamente controlem a formação dos biofilmes e previnam as complicações geradas pela presença do mesmo devem ser incentivadas (SILVA et al, 2017, BOWEN, 2018). Surge assim, o interesse para pesquisas com plantas medicinais, em função dos seus potenciais terapêuticos para o desenvolvimento de novos fármacos com amplo espectro de ação e que estejam associados a uma menor toxicidade (ROCHA et al. 2013). Tal condição tem a descoberta de compostos isolados, com potencial terapêutico, como principal objetivo (SILVA et al, 2012, NEWMAN, CRAGG, 2016).

2.3 *Syzygium aromaticum*

Dentre as plantas utilizadas na medicina popular destaca-se a *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry, conhecida popularmente por cravo, cravo-da-índia ou cravo-do-reino. Esta planta ainda possui diversos sinônimos taxonômicos para seu nome científico, dentre eles pode-se destacar: *Caryophyllus aromaticum* L., *Eugenia aromática* (L.) Baill, *Eugenia caryophyllata* Thunb., *Jambosa caryophyllus* (Spreng.) Nied. (GHEDIRA et al, 2010). A *S. aromaticum* consiste em uma planta arbórea nativa das Ilhas Molucas, localizada na Indonésia, e é reconhecida por seu odor e sabor característico (SILVESTRI et al, 2010). Pertence à família Myrtacea, a qual é caracterizada pela reconhecida riqueza em óleos essenciais. No Brasil, todos os seus

representantes nativos são derivados da subfamília Myrtoideae (LIMBERGER et al, 2004, CERQUEIRA et al, 2009, SILVESTRI et al, 2010). Sua arvore pode atingir 8 a 12 metros de altura, possuindo folhas ovais grandes e numerosos cachos terminais de flores de coloração vermelha (ALMA et al, 2007, KAMATOU et al, 2012).

A parte constituinte da planta que é comercializada são os botões florais, estes são colhidos na forma de botão floral maduro, quando atingem cerca de 1,5 a 2 cm de comprimento, e comercializados como botão floral seco (ALMA et al, 2007, OLIVEIRA et al, 2007). Na constituição destes pode ser encontrado cerca de 18% de óleo essencial, sendo o seu principal composto, cerca de 89%, o eugenol, seguido por outras substâncias como o β -cariofileno, álcool benzílico, α -humulen, β -pineno, farnesol, benzaldeído e outros (JIROVETZ et al, 2006, CHAIEB et al, 2007, OLIVEIRA et al, 2015).

A medicina popular utiliza esta planta para o tratamento da halitose e dor de dente (SANTOS et al, 2009), como chá para combater a dispepsia (MOSCA, LOIOLA, 2009), como composto carminativo (ARGENTA et al, 2011), como analgésico e anti-inflamatório (CHAIEB et al, 2007, HALDER, 2011, BACHIEGA et al, 2011, HALDER et al, 2012), para o tratamento de infecções cutâneas, orais e do trato geniturinário (KHAN, AHMAD, 2012, RODRIGUEZ et al, 2014).

No tocante às comprovações científicas, o óleo essencial da *S. aromaticum* possui ação antibiofilme (KHAN, AHMAD, 2012, BUDRI et al, 2015), ação antifúngica, frente ao gênero *Aspergillus* e ao gênero *Candida*, incluindo cepas resistentes ao fluconazol, como a *Candida krusei* e a *Candida glabrata* (PINTO et al, 2009, MANSOURIAN et al, 2014). Apresenta também ação antibacteriana frente a *Enterococcus faecalis* (KHAN et al. 2009, GUPTA et al, 2013), ao *Lactobacillus acidophilus* e ao *Staphylococcus aureus* (ISMAIL et al, 2017, BESRA, KUMAR, 2018).

Apesar dos resultados positivos da *S. aromaticum*, não existe evidência científica da sua ação inibitória em biofilme multiespécie da cavidade oral obtido a partir da saliva *in natura* de pacientes com candidose. Estudos complementares devem ser realizados para validá-la como alternativa eficaz no possível prevenção e/ou tratamento de doenças orais causadas por biofilmes. Adicionalmente, há o incentivo da literatura para a realização de estudos que possam identificar, em plantas medicinais, compostos ativos cabíveis para a aplicação na clínica odontológica (ROCHA et al. 2013, CHINSEMBU, 2016, NEWMAN, CRAGG, 2016, BOWEN, 2018).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* a atividade inibitória do óleo essencial da *Syzygium aromaticum* sobre a formação de biofilme multiespécie oriundo da cavidade oral.

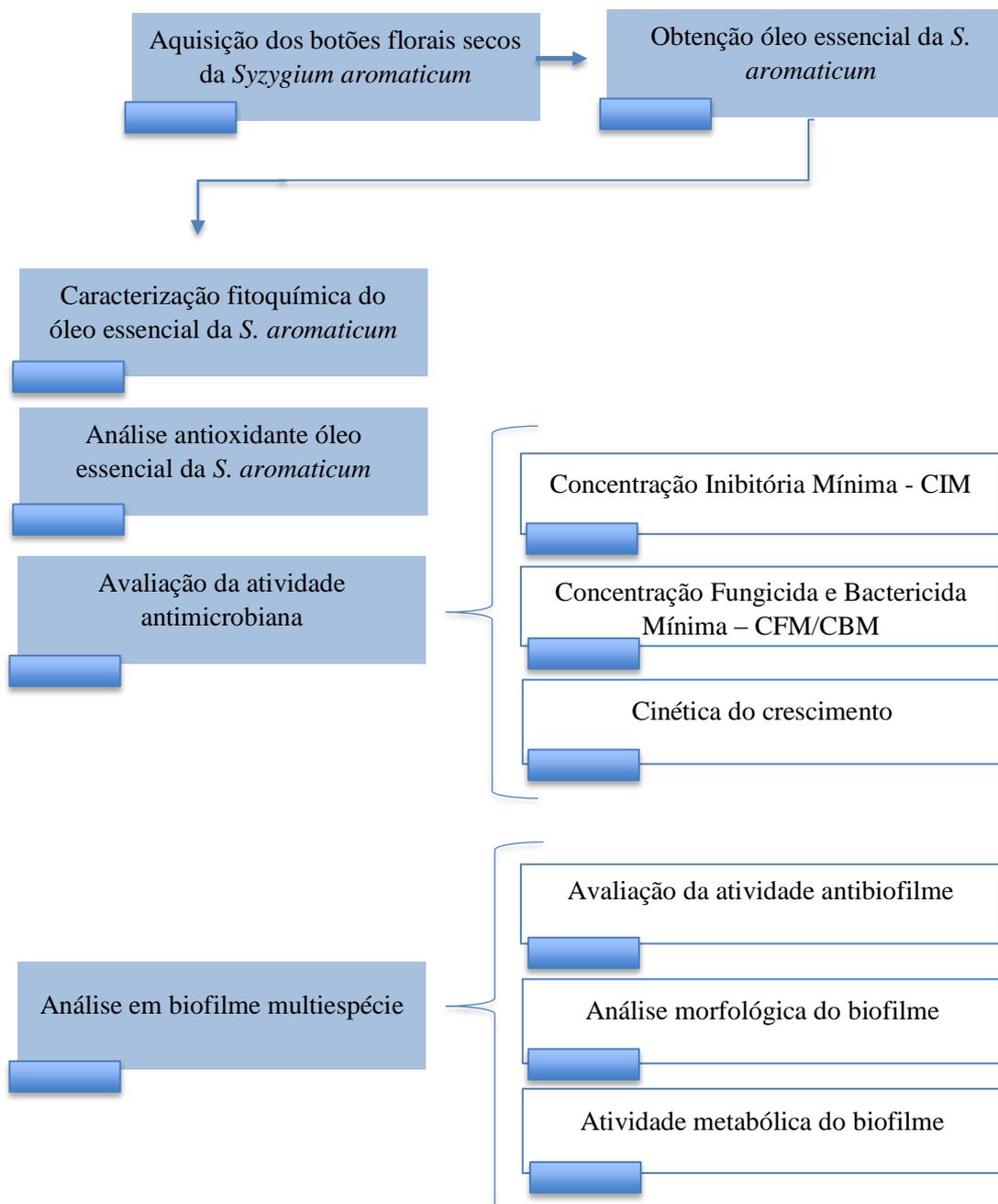
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar o perfil fitoquímico do óleo essencial da *Syzygium aromaticum* através de técnicas cromatográficas;
- Estabelecer a capacidade antioxidante do óleo essencial da *Syzygium aromaticum* através do método de redução do radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl);
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentrações Bactericida e Fungicida Mínima (CBM/CFM) do óleo essencial da *Syzygium aromaticum*;
- Constatar a ação do óleo essencial da *Syzygium aromaticum* frente a cinética de crescimento de espécies de *Candida*;
- Verificar a capacidade do óleo essencial da *Syzygium aromaticum* em inibir a formação de biofilme multiespécie;
- Analisar a morfologia do biofilme multiespécie tratado com o óleo essencial da *Syzygium aromaticum*;
- Analisar a atividade metabólica do biofilme multiespécie tratado com o óleo essencial da *Syzygium aromaticum*;

4 METODOLOGIA

4.1 CARACTERIZAÇÃO E SEQUÊNCIA METODOLÓGICA DO ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental *in vitro*, realizado, no Laboratório de Análises e Diagnóstico – LAD, localizado no departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, Campina Grande – PB. A análise fitoquímica foi realizada no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises – LMCA, localizado no departamento de Farmácia da Universidade Federal da Paraíba - UFPB. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição sob registro de número: 96856718.2.0000.5175. A sequência metodológica do estudo encontra-se no fluxograma abaixo:



4.2 MATERIAL VEGETAL

4.2.1 Aquisição do material vegetal

O óleo essencial foi obtido a partir dos botões florais secos da *Syzygium aromaticum* que foram adquiridos em comércio, na feira central da cidade de Campina Grande - PB.

4.2.2 Obtenção do óleo essencial

O óleo essencial da *S. aromaticum* foi obtido por hidrodestilação em sistema extrator do tipo Clevenger, acoplado a um balão de fundo redondo e à uma manta elétrica como fonte geradora de calor. Foram utilizadas 60 gramas dos botões florais secos triturados para 240mL de água destilada, por aproximadamente duas horas. Em seguida, o óleo essencial passou pelo processo de percolação utilizando sulfato anidro de sódio (Na_2SO_4), na proporção de 1 parte de sulfato anidro para 4 partes de óleo essencial (m/v), para completa retirada da água. Por fim, o óleo essencial obtido foi acondicionado em frasco de vidro âmbar e mantido sob refrigeração.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

O óleo essencial da *S. aromaticum* foi analisada por cromatógrafo gasoso (CG) acoplado a espectrômetro de massas (EM) com ionização por impacto de elétrons (IE) a 70 eV (modelo GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu), com coluna cromatográfica RTX-5MS (30 m/0,25 mm/0,25 μm df). A temperatura do injetor foi de 220°C. A temperatura inicial foi de 60°C com gradiente de temperatura a 240°C na proporção de 3°C/minuto. O fluxo de gás (hélio) foi de 1,1 mL/minuto, modo *split*. A faixa espectral de massas analisada foi m/z 30-600. Os dados foram comparados com as bibliotecas comerciais Wiley08 e NIST08, e os metabólitos foram identificados pelos seus índices de retenção (IR), calculados com o padrão de n-alcenos (C7-C40, Sigma-Aldrich) analisados nos mesmos parâmetros do CG-EM da amostra.

4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante do óleo essencial da *S. aromaticum* foi estabelecida pelo método de captura do radical livre DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl), adaptado de Scherer, Godoy, (2009). Alíquotas de 0,1 ml do óleo essencial em diferentes concentrações (2000, 1000, 500, 250 e 125 µg/ml) foram adicionadas à 3,9 ml da solução de DPPH 0,0800mM (Sigma-Aldrich®), o mesmo volume do óleo essencial foi substituído por metanol para constituição do branco da amostra. Como controle positivo foi utilizado o ácido gálico (25, 50, 75, 100 e 150 µg/ml) (NEON®). As amostras foram mantidas em temperatura ambiente e protegidas da luz até que se fosse feita a leitura em espectrofotômetro (BioPet Technologies - 722G) à 517nm, nos tempos de 45 e 60 min. As leituras foram feitas em triplicatas e em três momentos distintos.

Foi calculada a porcentagem da atividade antioxidante (AA%) a partir da seguinte fórmula: $AA\% = [(A_b - A_a) / A_b] \times 100$, onde A_b é a absorbância do branco e A_a é a absorbância da amostra nas diferentes concentrações. A partir da AA% foi gerado um gráfico no qual foi calculado, com base na equação do gráfico, a IC_{50} , que expressa qual a concentração da amostra capaz de expressar 50% da redução de íons DPPH. Por fim foi calculada o índice de atividade antioxidante (IAA) a partir da seguinte fórmula: $IAA = \text{Concentração final do DPPH } (\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}) / IC_{50} (\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1})$. Foi utilizado a classificação de Scherer e Godoy (2009) para classificar a ação do óleo essencial da *S. aromaticum* quanto ao IAA, seguindo o seguinte parâmetro: $IAA \leq 0,5$ =atividade fraca; $0,5 < IAA \leq 1$ =atividade moderada; $1 < IAA \leq 2$ = atividade forte; e $IAA > 2$ =atividade muito forte.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Atividade antimicrobiana foi avaliada a partir da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Fungicida Mínima (CFM) e Bactericida Mínima (CBM), de acordo com as normas M27-A3 e M07-A9 *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2008, 2009), e através da cinética de crescimento celular de espécies de *Candida albicans*, a qual não foi realizada com espécies de bactérias em função dos resultados da CIM.

4.5.1 Microrganismos

Foram utilizados isolados frescos de bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli*, as quais foram disponibilizadas pelo laboratório Diagnose/Clínica de Análises especializadas – LTDA, Campina Grande, Paraíba, e cepas padronizadas de leveduras do gênero *Candida*: *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida krusei* ATCC 34135, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 60193, assim como duas cepas de *Candida albicans*, proveniente de lesões de candidose oral de pacientes da clínica-escola do departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba. Os microrganismos do biofilme multiespécie foram provenientes da saliva de pacientes com candidose oral.

4.5.2 Preparo de inóculo

4.5.2.1 Fungos

Uma cultura de cada espécie de *Candida* foi reativada em meio caldo Ágar Sabouraud Dextrose (Merck®), e incubada por 24 horas a 35°C. Em seguida, as células foram suspensas em meio Caldo Sabouraud Dextrose (Kasvi®). A concentração da suspensão fúngica foi determinada em câmara de Neubauer (KASVI®) com obtenção de uma densidade celular final de 2×10^3 unidades formadoras de colônias (UFC)/mL.

4.5.2.2 Bactérias

Os microrganismos foram reativados em meio de cultura caldo Brain Heart Infusion (BHI) por 24 horas a 35°C, após esse período, coletou-se uma alíquota de aproximadamente 300 µL que foi adicionada em 4mL de BHI. A concentração da suspensão bacteriana foi determinada no espectrofotômetro (BioPet Technologies - 722G) com comprimento de onda 625nm, absorvância 0,08-0,1. Se o intervalo de absorvância for atingido, tem-se um inóculo com a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, fez-se então diluições, em solução salina, na proporção de 1:10 para se atingir a concentração final do inóculo de $1,5 \times 10^5$ UFC/mL.

4.5.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Fungicida e Bactericida Mínima (CFM e CBM)

As análises foram realizadas em microplacas de 96 poços, utilizou-se o método da microdiluição em caldo. Inicialmente, são inseridos em todos os poços meio de cultura para bactérias ou leveduras, Mueller-Hinton Broth (BBL™) e Caldo Sabouraud Dextrose (Kasvi®), respectivamente. Em seguida, inseriu-se o óleo essencial da *S. aromaticum* (8000 µg/mL), no qual foi diluído no meio de cultura utilizado, acrescentando-se como veículo 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) (v/v) e procedeu-se a microdiluição seriada, obtendo-se concentrações entre 2000 e 0,4882 µg/mL. Cloranfenicol 500 µg/mL (Sigma-Aldrich®) e nistatina 500 µg/mL (Sigma-Aldrich®) foram utilizados como controles farmacológicos. Ao final, os inóculos bacteriano (5×10^5 UFC/mL) e fúngico ($2,5 \times 10^3$ UFC/mL) foram adicionados (100 µL/poço) e as placas incubadas a 35°C por 24 horas.

A CIM foi definida como a menor concentração da amostra que inibiu o crescimento microbiano visível, confirmado pelo revelador resazurina 0,01% (20 µL/poço).

Para análise das Concentrações Bactericida Mínima (CBM) e Fungicida Mínima (CFM) uma alíquota de 20 µL de cada poço, com concentração igual e/ou maiores que a CIM, foram sub-cultivadas em meio BHI Agar (bactérias) e Ágar Sabouraud Dextrose (leveduras), e incubadas a 35°C por 24 horas. As CBM e CFM são definidas como a menor concentração que inibiu o crescimento dos subcultivos. Os ensaios serão realizados em triplicata e em três experimentos independentes.

4.5.4 Cinética de crescimento

Foi avaliado o efeito do óleo essencial da *S. aromaticum* sob a cinética do crescimento de espécies de *C. albicans* (ATCC 60193, ATCC 10231 e duas cepas clínicas), segundo Seleem et al. (2016) com algumas modificações. O óleo essencial da *S. aromaticum* foi avaliado em concentrações baseadas na CIM obtidas para as espécies de *C. albicans*, 500 µg/mL (CIM), 1000µg/ml (2xCIM) e 2000µg/ml (4xCIM). O teste foi realizado em placa de 96 poços, nos quais foram inseridos o inóculo ($2,5 \times 10^3$ UFC/mL) e o óleo essencial, que foi adicionado respeitando a proporção de 10% do volume total da solução. Como controle positivo utilizou-se a nistatina (500 µg/mL). As

placas foram incubadas a 35°C sob agitação e em intervalos pré-determinados (0, 1, 2, 4, 6 e 24h) foram retiradas alíquotas de 10µl da solução, as quais foram plaqueadas em placas contendo meio ágar sabouraud dextrose. Após o período de incubação de 48h à 35°C foi realizada a contagem das UFCs. O teste foi realizado em triplicata e em três momentos distintos.

4.6 ANÁLISE EM BIOFILME MULTIESPÉCIE

A análise foi realizada a partir da formação de um biofilme multiespécie derivado da saliva coletada de pacientes com candidose oral, baseada na metodologia de Souza et al (2018), com modificações no substrato de adesão do biofilme, no meio de cultura utilizado, assim como no intervalo destinado a troca do meio, e nos meios de cultura para identificação dos microrganismos presentes na saliva. O caráter multiespécie da saliva, e conseqüentemente do biofilme, foi comprovado através de sub-cultivos em meios de cultura específicos.

Foram utilizados os meios de cultura: 1) Agar Brain Heart Infusion – BHI acrescido de 5% de sangue desfibrinado, no qual as bactérias foram identificadas com base na formação do halo de hemólise, para a constatação da presença de bactérias do gênero *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp, 2) Agar Mitis Salivarius (Difco®) suplementado com 3,3mg/mL de Bacitracina (Sigma-Aldrich®) e 15% de sacarose, para identificação de *S. mutans* e 3) Chromagar *Candida* (Difco®) para identificação presuntiva de espécies de *Candida*. As placas contendo Chromagar *Candida* foram incubadas à 35°C, as demais placas foram incubadas, a 37°C, com 5% de CO₂. A leitura visual do crescimento microbiano foi realizada após 48 horas.

4.6.1 Coleta da saliva

A saliva total necessária para o experimento foi coletada de cinco doadores sem comprometimento sistêmico, correspondendo aos seguintes critérios de inclusão: possuir mais que 18 anos de idade; ter fluxo salivar normal, obedecendo ao critério: fluxo de saliva estimulado maior que 1 mL por minuto e fluxo de saliva não estimulado maior que 0,3 mL por min; e apresentar diagnóstico de candidose. Foram considerados como critérios de exclusão: pacientes edêntulos totais e que tenham ingerido

antimicrobianos no último mês. Os pacientes foram orientados a não beber ou comer no período de 2h antes da coleta da saliva.

A saliva foi coletada sob estimulação, através da mastigação de pequenos bloquinhos constituídos por um material de borracha (Parafilm M®) durante 10 minutos. Após a coleta houve a mistura das salivas obtidas constituindo um único estoque, o qual foi diluído em glicerol (70% de saliva e 20% de glicerol). Alíquotas de 1mL foram armazenadas em -80 °C (PRATTEN et al, 2003).

4.6.2. Análise da inibição do biofilme multiespécie

O biofilme multiespécie foi formado em superfície abiótica, utilizando o fundo de microplacas de 24 poços, conforme metodologia adaptada de Souza et al (2018). Foram adicionados 1470µl de meio RPMI 1640 (INLAB®) suplementado com 0,2% de sacarose (Dinâmica®), 30µL de saliva e 100µL do óleo essencial em duas concentrações selecionadas com base nos valores da CIM para bactérias, uma vez que os valores obtidos foram maiores, 2000µg/mL (CIM) e 4000µg/mL (2xCIM), utilizando-se como veículo o DMSO 5%. Como controle positivo utilizou-se a clorexidina 500µg/mL (Sigma-Aldrich®). A placa foi incubada a 5% de CO₂ e 37°C, durante 72h, A cada 24h o sobrenadante foi descartado e foi adicionado um novo meio com saliva humana fresca e com 0,2% de sacarose, os tratamentos também foram renovados. Após o tratamento do biofilme, alíquotas de cada poço (10 µl) foram transferidas para os meios de cultura específicos os mesmos citados anteriormente para caracterizar o perfil microbiológico da saliva.

4.6.3 Análise morfológica do biofilme

O biofilme foi analisado em microscópio invertido com kit de fluorescência (MOTIC® – AE31 Elite Trinocular). Após 48 horas de incubação o biofilme foi homogeneizado e centrifugados em microtubos do tipo eppendorf, à 6000g por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o biofilme ressuspense em Tampão fosfato-salino (PBS) para lavagem. Realizou-se uma nova centrifugação, o sobrenadante foi retirado e adicionado 50µl de calcofluor White 1% (v/v) (Sigma-Aldrich).

4.6.4 Atividade metabólica do biofilme

A atividade metabólica do biofilme foi pelo ensaio de redução de XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) (Sigma-Aldrich®) (DA SILVA et al., 2008, DA SILVA, 2012). O XTT foi dissolvido em PBS na proporção de 1mg/mL, a solução foi filtrada e armazenada sob refrigeração até o uso. Foi preparada também a solução de menadiona (Sigma-Aldrich®). O sobrenadante foi retirado e inserido 1580µL de PBS enriquecido com 200mM de glicose (Dinâmica®), 400µL de solução de XTT e 20µL de menadiona (0,4mM dissolvida em acetona P.A.). As placas foram incubadas por 3h na ausência de luz, a 35°C, sob agitação (75 rpm). O conteúdo dos poços foi coletado e centrifugado (6000g, 5 min). A absorbância dos sobrenadantes foi lida em espectrofotômetro (Microplate Reader - EZ READ 400, BIOCHROM) à 490nm. A intensidade colorimétrica é expressa como diretamente proporcional à atividade metabólica do biofilme. A porcentagem de redução da atividade metabólica foi calculada como $Ab_{490} = Ab \text{ amostra} / Ab \text{ controle} \times 100$. No qual Ab significa absorbância.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises foram feitas em triplicatas, em três momentos distintos. Quando aplicável, os dados foram expressos como média e desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas no programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS Statistics, v. 23, IBM, Chicago, IL.). Inicialmente os dados foram avaliados quanto a sua distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Sminorv. Para a análise dos dados da cinética de crescimento foi realizada o teste de Friedman, seguido pelo teste de Kruskall-Wallis. Para as demais análises foram realizadas comparações estatísticas entre os grupos através de análise de variância (ANOVA), seguida dos Testes de pós-hoc de Turkey e de Dunnet. A significância foi aceita para um valor de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

A análise por CG-EM do óleo essencial da *S. aromaticum* constatou o eugenol como composto majoritário identificado com valor de 74,54% de área integrada. Outros compostos em proporções menores também foram identificados, como acetato de eugenol (2,75%) e do β -Cariofileno (0,65%) (Tabela 1).

Tabela 1: Compostos identificados no óleo essencial da *S. aromaticum*, por cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG-EM).

COMPOSTO	TR	IR	AREA (%)
ácido salicílico	15,195	1197	0,07
Chavicol	17,935	1259	0,05
Anetol	19,215	1288	0,04
Eugenol	22,76	1368	74,54
β -Cariofileno	25,075	1422	0,65
α -Humuleno	26,510	1456	0,08
Acetato de eugenol	29,635	1531	2,75
Óxido de cariofileno	31,87	1587	0,08
Miristato de isopropila	40,89	1827	0,12

TR = Tempo de retenção; IR = Índice de retenção; AREA (%) = fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma;

5.2 ANÁLISE ANTIOXIDANTE

A análise antioxidante com base na redução do radical DPPH foi expressa como IC₅₀, média e desvio padrão, e o Índice de atividade antioxidante (IAA) (Tabela 2). Pôde-se observar que houve diferença significativa na IC₅₀ do óleo essencial da *S. aromaticum* entre os dois tempos analisados. Para o controle positivo (ácido gálico), não houve diferença significativa entre os tempos, mas o mesmo diferiu significativamente do óleo essencial analisado. Com base nos valores obtidos na IAA e na classificação de Scherer e Godoy (2009), o óleo essencial assumiu a classificação de

forte atividade antioxidante para o tempo de 45 min e fraca atividade para o tempo de 60 min, o ácido gálico foi considerado como tendo forte atividade antioxidante nos dois tempos analisados.

Tabela 2: Valores do Índice de atividade antioxidante (IAA) e da IC₅₀ calculados com base na concentração final do DPPH (31,6 µg/ml).

TEMPO	COMPOSTO	IC ₅₀ (µg/ml)	IAA
45:00 min	<i>S. aromaticum</i>	25,74 ± 16,97 ^a	1,22
	Ácido gálico	1,57 ± 0,47 ^b	20,12
60:00 min	<i>S. Aromaticum</i>	93,33 ± 9,29 ^c	0,33
	Ácido gálico	2,73 ± 0,11 ^b	11,57

*Letras diferentes assumem diferença significativa (p < 0,05)

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Fungicida e Bactericida Mínima (CFM e CBM)

O óleo essencial da *S. aromaticum* apresentou atividade antimicrobiana frente à todas as cepas testadas, com resultados mais expressivos frente as espécies de *Candida* (CIM 500-1000 µg/mL, CFM 1000-2000µg/mL) quando comparados com aqueles encontrados para bactérias (CIM 2000 µg/mL, CBM > 2000 µg/mL). Verificou-se perfil fungicida frente à todas as cepas de *Candidas* testadas (CFM/CIM < 4) (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição dos valores das Concentrações Inibitória Mínima (CIM), Fungicida Mínima (CFM) e Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial de *S. aromaticum*, de acordo com a espécie de *Candida* e bactéria.

Microorganismos	<i>S. aromaticum</i>		CFM/ CIM	Nistatina/ Clorafenicol CIM
	CIM µg/mL	CFM/ CBM µg/mL		
<i>Candida albicans</i> - ATCC 10231	500	1000	2	3,9062
<i>Candida albicans</i> - ATCC 60193	500	1000	2	3,9062
<i>Candida albicans</i> – Cepa clínica A1	500	1000	2	3,9062
<i>Candida albicans</i> – Cepa clínica A5	500	1000	2	1,9531
<i>Candida parapsilosis</i> – ATCC 22019	500	1000	2	3,9062
<i>Candida tropicalis</i> – ATCC 750	500	1000	2	3,9062
<i>Candida glabrata</i> – ATCC 90030	500	1000	2	3,9062
<i>Candida krusei</i> – ATCC 34135	1000	2000	2	3,9062
<i>Streptococcus mutans</i> - Cepa clínica	2000	>2000	-	3,9062
<i>Staphylococcus aureus</i> - Cepa clínica	2000	>2000	-	3,9062
<i>Escherechia coli</i> - Cepa clínica	2000	>2000	-	3,9062

Fungicida (CFM/CIM < 4) ou fungistático (CFM/CIM ≥ 4) (SIDDIQUI et al., 2013).

* (-) Não foi possível determinar a razão CFM/CIM.

5.3.2 Cinética de crescimento

Em relação à cinética do crescimento para as cepas de *C. albicans* analisadas, o óleo essencial da *S. aromaticum* na concentração de 500 µg/mL não apresentou diferença entre os resultados e o controle negativo. Porém, nas concentrações de 1000 µg/mL e de 2000 µg/mL (Figura 1, Figura 2, Figura 3 e Figura 4) apresentaram resultados similares ao controle positivo (Nistatina), a partir do tempo de 2 horas, sem diferença estatisticamente significativa.

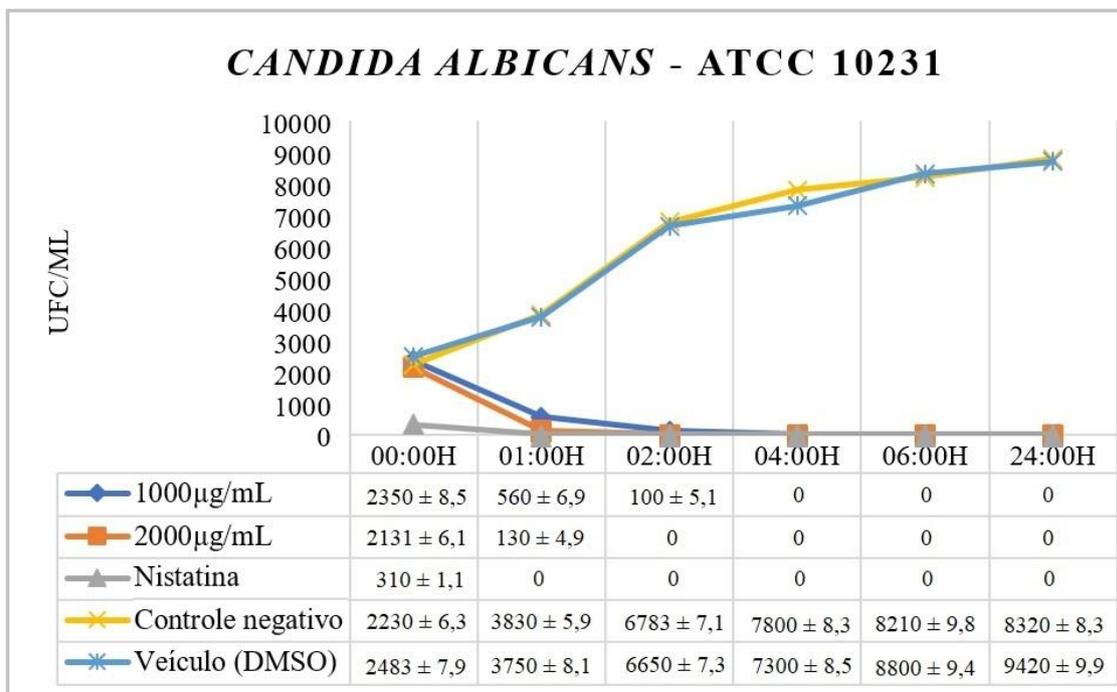


Figura 1: Efeito do óleo essencial da *S. aromaticum*, nas concentrações de 1000 µg/mL e 2000 µg/mL, e do controle positivo (nistatina), sob a cinética do crescimento da *C. albicans* - ATCC 10231.

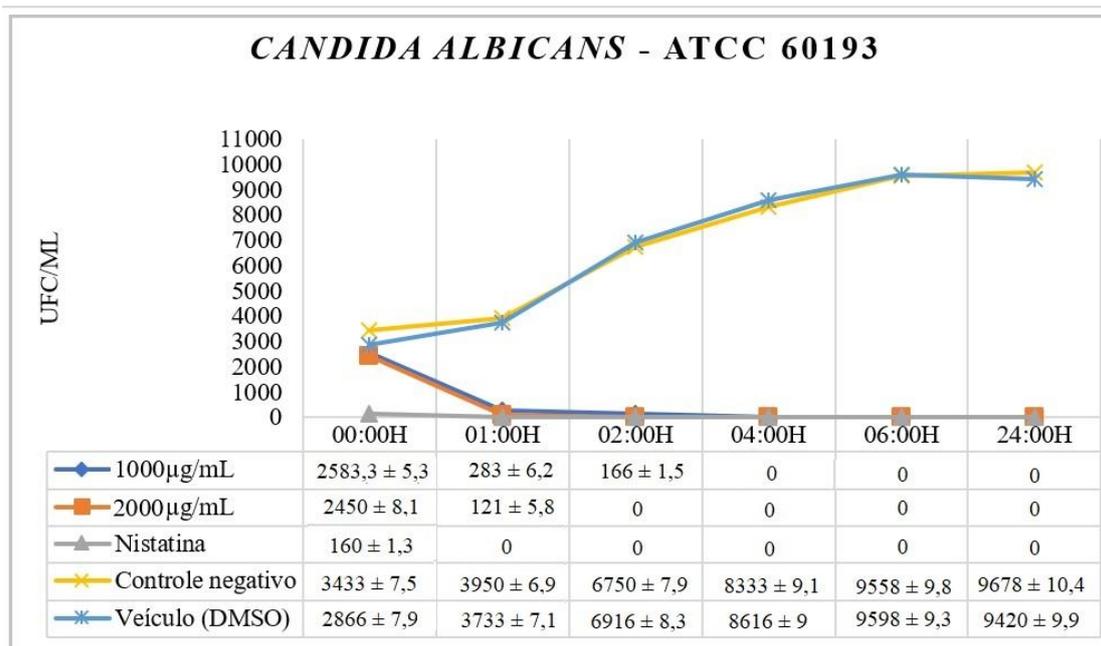


Figura 2: Efeito do óleo essencial da *S. aromaticum*, nas concentrações de 1000 µg/mL e 2000 µg/mL, e do controle positivo (nistatina), sob a cinética do crescimento da *C. albicans* - ATCC 60193.

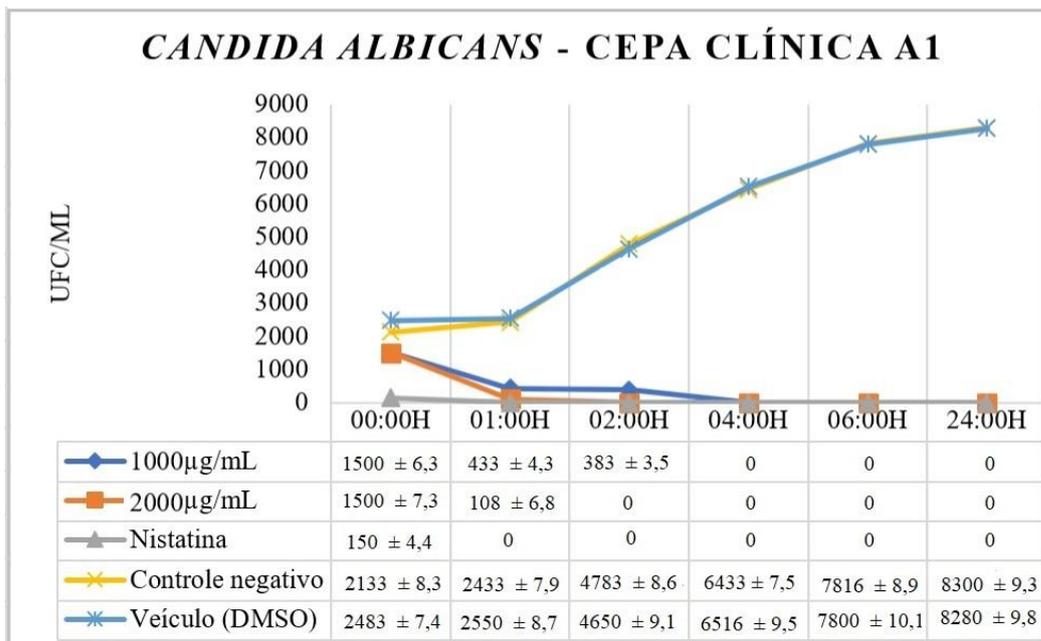


Figura 3: Efeito do óleo essencial da *S. aromaticum*, nas concentrações de 1000 µg/mL e 2000 µg/mL, e do controle positivo (nistatina), sob a cinética do crescimento da *C. albicans* cepa clínica A1.

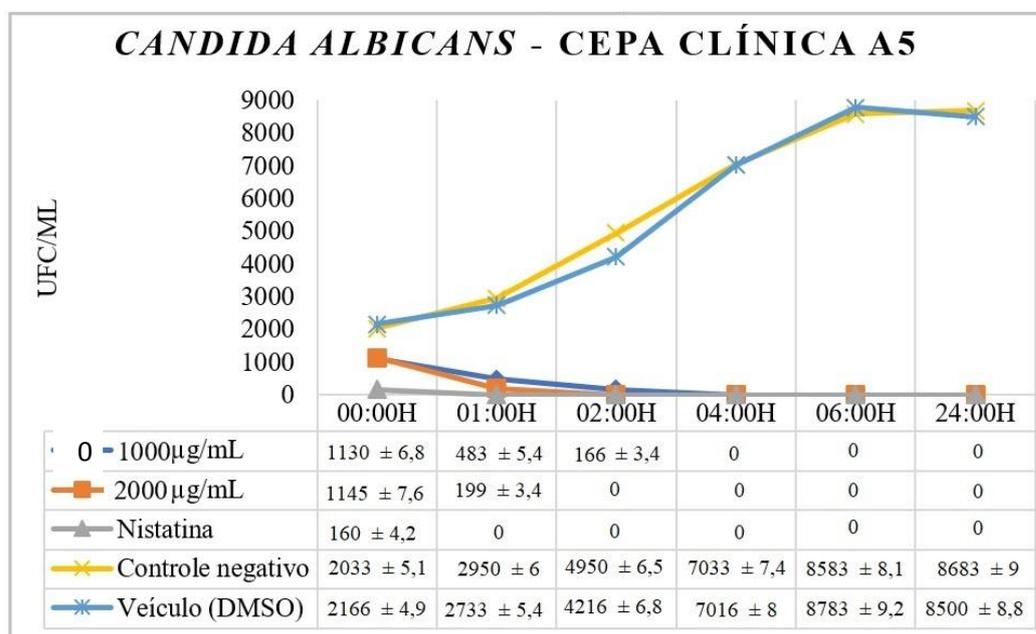


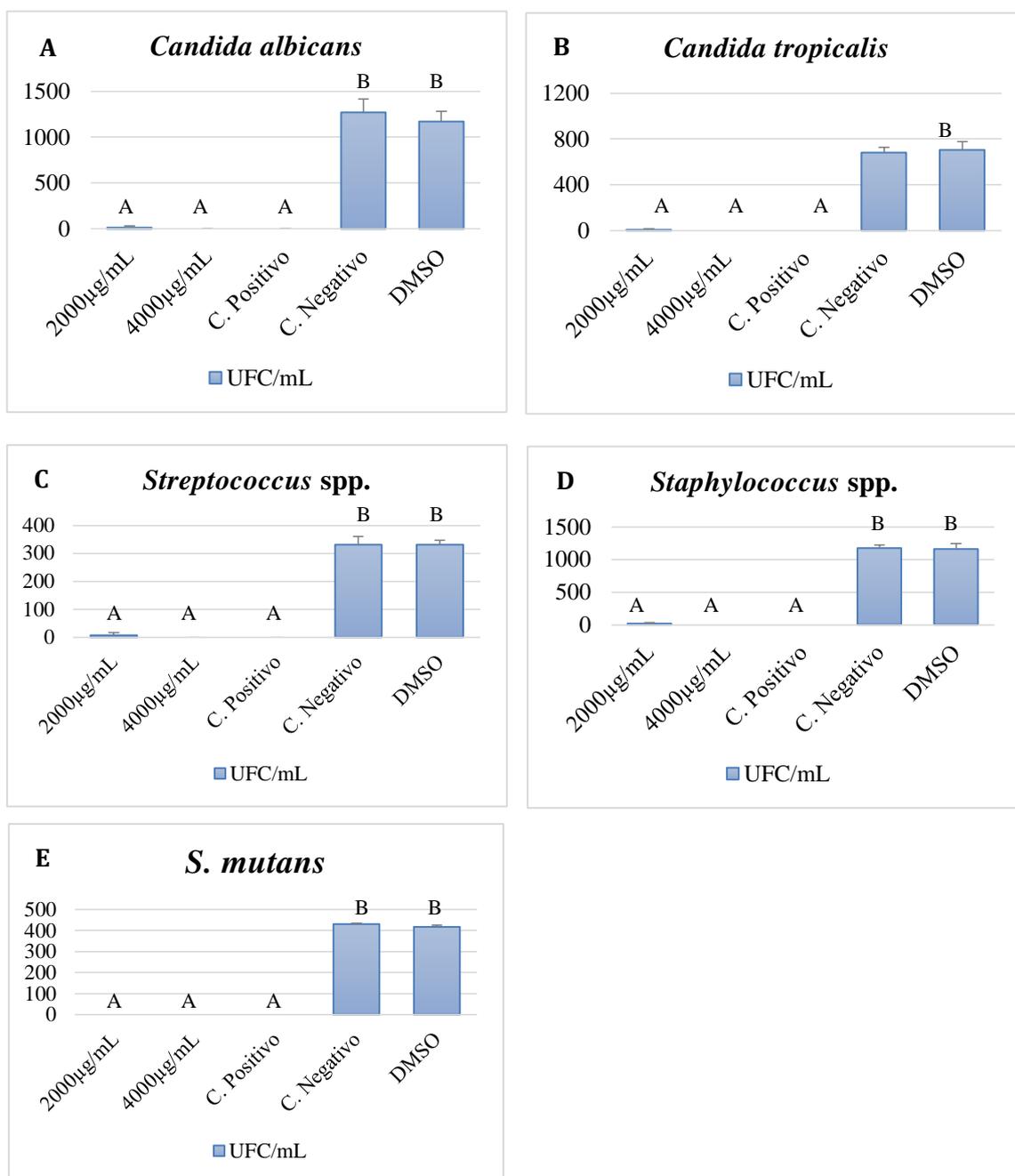
Figura 4: Efeito do óleo essencial da *S. aromaticum*, nas concentrações de 1000 µg/mL e 2000 µg/mL, e do controle positivo (nistatina), sob a cinética do crescimento da *C. albicans* cepa clínica A5.

5.4 ANÁLISE EM BIOFILME MULTIESPÉCIE

5.4.1 Análise da atividade antibiofilme

A análise da viabilidade dos microrganismos após o tratamento do biofilme com o óleo essencial da *S. aromaticum* mostrou uma significativa redução na quantidade de

UFC/ml para todas as espécies, sem diferença estatística em relação ao controle positivo (Clorexidina).



*Letras diferentes assumem diferença estatística entre grupos ($p < 0,05$)

Figura 5: Quantidade de UFC/mL do biofilme multiespécie após o tratamento com o óleo essencial da *S. aromaticum* (2000 µg/mL e 4000 µg/mL) e com o controle positivo (clorexidina) das espécies de microrganismo: *C. albicans* (Figura 5A), *C. tropicalis* (Figura 5B), *Streptococcus* spp. (Figura 5C), *Staphylococcus* spp (Figura 5D) e *S. mutans* (Figura 5E).

5.4.2 Análise morfológica dos microorganismos

A análise morfológica feita a partir da microscopia de fluorescência com o corante *Calcofluor White* constata a formação do biofilme no controle negativo, caracterizado pela presença de leveduras e hifas (setas brancas) (Figura 6A).

Para as concentrações do óleo essencial 2000 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 6B) observa-se um menor acúmulo de biofilme, com estruturas celulares fragmentadas e amorfas. As imagens dos biofilmes tratados com o óleo essencial da *S. aromaticum* na concentração de 4000 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 6C) são semelhantes à do controle positivo (Clorexidina) (Figura 6D), onde observam-se estruturas amorfas, menor aglomerado de células e com baixa fluorescência.

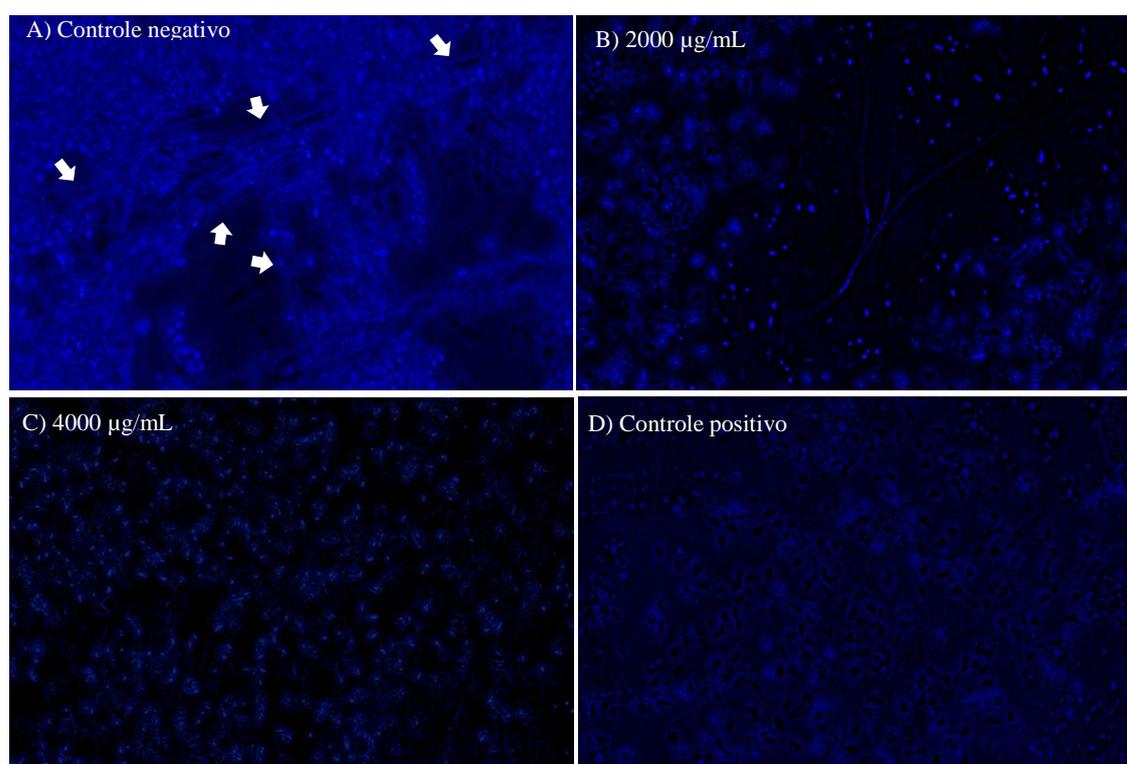
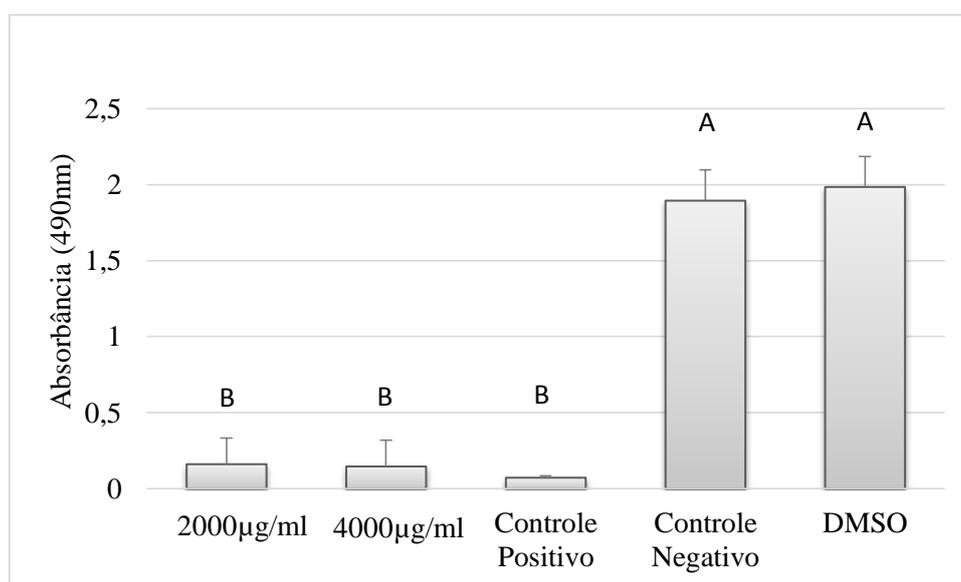


Figura 6: Imagens representativas da morfologia do biofilme multiespécie desenvolvido a partir da saliva de pacientes com candidose oral e tratado com óleo essencial da *S. aromaticum* nas concentrações 2000 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 6B) e 4000 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 6C), corado com calcofluor White. As imagens mostram o aspecto morfológico do controle positivo (clorexidina) (6D) e do controle negativo. No controle negativo (Figura 6A) as setas brancas evidenciam a presença de hifas. Todas as imagens foram feitas com a objetiva de 40x.

5.4.3 Atividade metabólica do biofilme

Com base no método do XTT, pôde-se avaliar a redução da atividade metabólica do biofilme após o tratamento com o óleo essencial da *S. aromaticum* (Figura 7), o qual reduziu significativamente a atividade do biofilme quando comparados ao controle negativo. Não houve diferença estatística entre as concentrações 2000 µg/ml e 4000 µg/ml e o controle positivo (Clorexidina). A tabela 4 apresenta o resultado em porcentagem de inibição da atividade metabólica do biofilme em relação ao controle negativo.



*Letras diferentes assumem diferença significativa ($p < 0,05$)

Figura 7: `Valores de absorbância, à 490nm, obtidas na avaliação da atividade metabólica do biofilme pelo método do XTT.

Tabela 4: Porcentagem de redução da atividade metabólica do biofilme em relação ao controle negativo

Grupo	% de redução da atividade metabólica
2000 µg/ml	91,40%
4000 µg/ml	92,19%
Clorexidina (500 µg/ml)	96,09%

6 DISCUSSÃO

O óleo essencial da *S. aromaticum* se apresentou como uma fonte promissora de compostos bioativos capazes de inibir a formação de um biofilme multiespécie, proveniente da cavidade oral. A partir da análise microscópica do biofilme, foi possível constatar a alteração na estrutura morfológica dos microrganismos, assim como, a redução dos aglomerados celulares, confirmada pela redução na fluorescência. Alterações relacionadas à parede celular e membranas dos microrganismos já foram constatadas em outros estudos, nos quais foram percebidas deformações na morfologia normal da célula, causadas pela ação do óleo essencial da *S. aromaticum* (XU et al, 2016, KHAN, AHMAD, 2012). Por outro lado, no biofilme sem tratamento (controle negativo) foi perceptível o acúmulo denso de microrganismos com estrutura preservada, constituindo um biofilme maduro, composto por espécies de *Candida* e bactérias, no qual as hifas identificadas assumiram um papel estrutural (CUI, 2013, BANERJEE et al, 2013), além de apresentar forte atividade metabólica (Absorbância₄₉₀ > 0.800) (Khan, Ahmad, 2012).

Estudos têm demonstrado a ação antibiofilme do óleo essencial da *S. aromaticum*, porém, em sua maioria são estudos de caráter monoespécie ou dual-espécie feitos com cultura microbiológicas de cepas padrão (KHAN, AHMAD, 2012, BUDZYNSKA et al, 2014, BUDZYNSKA et al, 2017, WALMIKI, RAI, 2017), fato que enaltece a proposta do presente trabalho em levar em consideração a aproximação da condição multiespécie do ambiente da cavidade oral (RODER et al 2016, BAKER et al 2017). Além disso, destaca-se a relevância clínica do efeito fungicida e bactericida do óleo essencial da *S. aromaticum* sobre o biofilme multiespécie. Sabe-se que a *C. albicans* e o *S. mutans*, por exemplo, podem desenvolver uma relação de cooperação para suprir as necessidades de substrato, metabólitos, fatores de crescimentos, além de influenciar a produção da matriz de substâncias extracelulares poliméricas, que são críticos para aderência do *S. mutans* e maturação do biofilme (HWANG et al, 2017, BARBOSA et al 2016).

Os resultados da atividade antimicrobiana e antibiofilme podem ser atribuídos ao eugenol, composto majoritário (74.54%), igualmente identificado em estudos anteriores (RADÜNZ et al 2019, RAJKOWSKA et al 2017, BUDZYNSKA et al, 2017, XU et al 2016, PINTO et al, 2009, CHAIEB et al 2007). O eugenol é caracterizado

como composto orgânico, com a presença de um anel aromático e pertencente à classe dos fenilpropanóides, grupo de metabólitos secundários presentes em uma variedade de plantas e seus derivados, em especial nos óleos essenciais (SÁ et al, 2014, FURUKAWA et al, 2003). Foram identificados também compostos secundários em menor proporção, mas que possuem ação antibacteriana, antioxidante e antifúngica (YOO, JWA, 2018, MUSTHAFA et al, 2016, DAHHAM et al, 2015).

O eugenol se destaca por sua atividade antifúngica (HASSAN et al, 2018, LABIB, ALDAWSARI, 2015, AHMAD et al, 2010) e antibacteriana (ZHANG et al, 2017, THOSAR et al 2013), nas quais ele age, de modo geral, de forma similar, tendo como alvo principal a parede celular e as membranas presentes nos microrganismos, o que aumenta a permeabilidade celular, fazendo com que ocorra o efluxo de constituintes importantes para sua sobrevivência, como a perda de K^+ e de outros componentes citoplasmáticos (AHMAD et al, 2010, HEMAISWARYA, DOBLE, 2009, FILGUERAS, VANETTI, 2006, DAS et al, 2016). O eugenol pode estar associado à inibição enzimática da ATPase e de proteases, por exemplo (HYLDGAARD et al, 2012, KHAN, AHMAD et al, 2012), assim como na indução do estresse oxidativo celular com o aumento das Espécies Reativas do Oxigênio – EROS, que causam danos estruturais à célula, como a ruptura de membranas (DAS et al, 2016, KHAN, AHMAD et al, 2012). Pode também propiciar a supressão de genes relacionados com a formação de proteínas extracelulares, que são importantes na adesão de microrganismos, etapa inicial da formação do biofilme (XU et al, 2016, LATIFAH-MUNIRAH et al, 2015, ADIL et al 2014, TAM et al, 2007, SENADHEERA et al, 2005).

Khan, Ahmad (2012) observaram uma redução de cerca de 60% do biofilme monoespécie de *C. albicans* após 18 a 20 horas de tratamento com o óleo essencial da *S. aromaticum* e Budzynska et al (2014) constataram uma redução de 95% da formação de tubos germinativos da *Candida*. Em um segundo momento, Budzynska et al (2017) avaliaram a ação do óleo essencial da *S. aromaticum* sobre um biofilme dual-espécie de *C. albicans* e *S. aureus* e constataram redução de aproximadamente 50% da formação de tubos germinativos pela *C. albicans*. Neste estudo, o efeito do óleo essencial da *S. aromaticum* sobre o biofilme multiespécie foi confirmado a partir da redução significativa do número de UFC/mL de todas as espécies presentes no biofilme, e da redução da atividade metabólica. Observou-se também ausência de tubos germinativos e hifas em todas as concentrações testadas do óleo essencial.

A redução da atividade metabólica do biofilme tratado com o óleo essencial da *S. aromaticum* foi de 91,4% para a concentração de 2000 µg/mL e de 92,19% para a concentração de 4000µg/mL quando comparados ao controle negativo. Este efeito pode ser atribuído também ao eugenol. Jafri et al (2018) verificaram redução de 52,65% da atividade metabólica de um biofilme dual-espécie, formado por *C. albicans* e *S. mutans*, sob a ação de 100 µg/mL de eugenol.

Os valores da CIM em estudos que fazem a comparação entre o óleo essencial da *S. aromaticum* e o eugenol são semelhantes, o que fortalece a associação do eugenol com as propriedades antimicrobianas da *S. aromaticum* (XU et al 2016, LABIB et al, 2015, MOON et al, 2011, PINTO et al, 2009).

Seguindo o parâmetro estabelecido por Holetz et al (2002) podemos classificar o óleo essencial da *S. aromaticum* como um composto de atividade antimicrobiana moderada frente às cepas de *Candida* testadas ($100\mu\text{g/mL} < \text{CIM} \leq 500\mu\text{g/mL}$) com exceção de *C. krusei*, para a qual a atividade foi considerada como fraca ($500\mu\text{g/mL} < \text{CIM} \leq 1000\mu\text{g/mL}$). Esta diferença pode ser atribuída à resistência de espécies *C. não-albicans* aos compostos antimicrobianos (PFALLER, DIEKEMA, 2007, MANSOURIAN et al, 2014). Entretanto, considerando a classificação de Duarte et al (2006), o óleo essencial da *S. aromaticum* assume a classificação de moderada atividade para a *C. krusei* ($600 \leq \text{CIM} < 1500\mu\text{g/mL}$) e forte atividade antifúngica ($\text{CIM} \leq 500\mu\text{g/mL}$) para as demais. Verifica-se também, com base na razão CFM/CIM, que o óleo essencial da *S. aromaticum* apresenta um perfil fungicida ($\text{CFM/CIM} < 4$) (SIDDIQUI et al, 2013).

No tocante à CIM obtida neste estudo para as cepas de *C. albicans*, pode-se observar que os valores encontrados foram semelhantes à CIM do eugenol obtida no estudo de Ahmad et al (2015). Entretanto diferiram de outros estudos, seja ao avaliar o eugenol, assumindo valores de 200 µg/mL (HASSAN et al 2018) e de 100 µg/mL (JAFRI et al 2018), ou ao avaliar a atividade do óleo essencial assumindo valores de 200 µg/mL (KHAN, AHMAD, 2012) e 3200 µg/mL (LABIB et al, 2015). A ação antifúngica do óleo essencial ainda foi comprovada por demais autores, porém, devido a diferenças metodológicas não há como comparar os valores da CIM obtidos. Budzynska et al (2014), ao avaliarem o óleo essencial da *S. aromaticum* determinaram sua CIM como 0,097% (V/V), Latifah-Munirah et al (2015), por sua vez, avaliaram o eugenol obtendo um valor de CIM de 1% (V/V) e Pinto et al (2009) encontraram valores de 0,64

$\mu\text{L/mL}$ (V/V) para o óleo essencial e para o eugenol frente a cepas de *C. albicans* e *C. não-albicans* analisadas.

O óleo essencial da *S. aromaticum* pode ser considerado como inativo frente às bactérias testadas (CIM > 1000 $\mu\text{g/mL}$) (HOLETZ et al 2002), ou como de atividade fraca (CIM > 1600 $\mu\text{g/mL}$) (DUARTE et al, 2006). Hernandez-Ochoa et al (2011) e Radünz et al (2018) avaliaram a sua atividade antibacteriana frente ao *S. aureus* e *E. coli* e obtiveram CIM de 500 $\mu\text{g/mL}$, e 304 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Apesar dos valores da CIM encontrados para as bactérias apontarem uma atividade fraca ou inativa, o óleo essencial da *S. aromaticum* mostrou-se eficaz na redução do biofilme multiespécie proveniente da cavidade oral, com resultados similares ao controle positivo (clorexidina).

A incompatibilidade dos resultados entre os estudos pode ser atribuída às diferenças metodológicas, às cepas utilizadas e ao material vegetal. Alguns estudos, por exemplo, usaram o óleo essencial comercial (LABIB et al, 2015, BUDZYNSKA et al, 2014, KHAN et al 2012, MOON et al, 2011) e outros fizeram a própria extração (XU et al., 2016, RADÜNZ et al, 2019). As interações entre seus compostos também justificam as diferenças em suas propriedades biológicas ou farmacológicas, cujas associações podem assumir efeitos sinérgicos ou antagônicos, influenciando diretamente os resultados.

A composição do óleo essencial pode variar, dentre outros aspectos, de acordo com a origem do material vegetal. O óleo essencial extraído neste estudo apresentou diferenças na proporção de compostos quando comparado ao óleo essencial apresentado em outros estudos. Xu et al (2016) destacaram a presença de 22 compostos, dentre eles o eugenol (76,23%), óxido de cariofileno (4,29%) e o acetato de eugenol (1,76%), Radünz et al (2019) identificaram 6 compostos, com destaque para o eugenol (56,06%), cariofileno (39,83%) e o α -cariofileno (4,31%). Já Chaieb et al (2007) destacaram a presença do eugenol (88,58%), acetato de eugenol (5,62%) e o β -cariofileno (1,38%). Já o nosso estudo identificou nove composto, sendo o eugenol o majoritário (74,54%), assim como os demais estudos, e compostos com menor proporção, como o acetato de eugenol (2,75%) e do β -Cariofileno (0,65%).

Em relação a curva de crescimento celular, foi observado no controle negativo condições normais de crescimento, sendo perceptível a fase Lag e a fase Log, com

crescimento exponencial a partir do período de 2h, em que a curva de crescimento teve um aumento gradual ao longo do tempo, característica que corresponde ao parâmetro de crescimento celular normal (LATIFAH-MUNIRAH et al, 2015, PANG et al, 2011). Já no grupo do óleo essencial da *S. aromaticum* houve redução do número de UFC/mL a partir da segunda hora. Esse resultado pode ser atribuído ao seu composto majoritário, o eugenol, uma vez que este pode reduzir 58% da *C. albicans* a partir do período de 2 horas (LATIFAH-MUNIRAH et al, 2015). O período de inibição do crescimento celular mostra que as cepas não conseguiram atingir a fase Log, fase de grande atividade enzimática celular (UPPULURI, CHAFFIN, 2007). Desta forma, a ação da *S. aromaticum* pode estar associada à inibição da atividade enzimática e ao aumento da permeabilidade celular (AHMAD et al, 2010, KHAN, AHMAD, 2012).

Quando em doses mais elevadas, o eugenol pode causar o estresse oxidativo, sendo este um dos princípios de ação frente à microrganismos, por outro lado, quando atribuído em doses mais baixas, está relacionado com propriedades antioxidantes, constituindo assim uma dupla ação, sendo esta dose-dependente (BARBOSA et al, 2018, HYLDGAARD et al, 2012, KHAN, AHMAD, 2012, KAMATOU et al, 2012, YADAV, BHATNAGAR, 2007). Esta característica pôde ser observada também nesse estudo, a IC_{50} obtida para o óleo no tempo de 45 minutos, no qual o óleo foi classificado como forte atividade antioxidante, é considerada bem mais baixa ($IC_{50} = 25,74 \mu\text{g/ml}$) do que a concentração que apresenta atividade antimicrobiana (CIM = $500 \mu\text{g/ml}$ para *C. albicans* e $2000 \mu\text{g/ml}$ para bactérias)

No tocante a sua atividade antioxidante, o óleo essencial da *S. aromaticum* apresentou forte atividade no tempo de 45 minutos e uma fraca atividade antioxidante em 60 minutos com base na classificação de Scherer, Godoy (2009), os mesmos autores encontraram uma atividade antioxidante considerada muito forte para o óleo essencial da *S. aromaticum* e para o ácido gálico. A diferença entre os valores obtidos nos diferentes tempos deste estudo pode ser atribuída à volatilidade do óleo essencial, reduzindo a capacidade antioxidante ao longo do tempo da análise, o que não acontece com o controle positivo, ácido gálico, que mantém sua atividade considerada como muito forte ao longo dos dois tempos.

A atividade antioxidante da *S. aromaticum* foi comprovada por outros autores, mas por diferenças metodológicas não houve o cálculo da IC_{50} , impossibilitando a comparação com o nossos resultados, como por exemplo, Ranünz et al (2019)

atribuíram ao óleo essencial da *S. aromaticum* uma forte atividade antioxidante na concentração de 484,7 µg/mL com índice de 94,86% de redução do DPPH. No tocante aos valores da IC₅₀ obtidos na literatura para a atividade antioxidante da *S. aromaticum*, percebe-se uma variação de acordo com o estudo. Scherer, Godoy (2009) encontram o valor de IC₅₀=3,05µg/mL, para uma concentração similar de DPPH usada neste estudo, já Perez-Roses et al (2016) constataram o valor de IC₅₀ = 117 µg/mL. No nosso estudo, para o tempo de 45min, no qual o óleo foi considerado como forte atividade antioxidante, obteve-se uma IC₅₀=25,74µg/mL, no tempo de 60min há um aumento na concentração para IC₅₀=93,33µg/mL, sendo neste tempo considerado como fraca atividade antioxidante pela classificação de Scherer, Godoy (2009). Essa variação entre os valores encontrados na literatura pode ser devido às variações de métodos utilizados.

A capacidade de redução do DPPH e conseqüente atividade antioxidante, está associada à doação de hidrogênio das substâncias testes à reação, característica marcante de compostos com grupo fenólico em sua composição, como o eugenol (PEREZ-ROSES et al, 2016). Portanto, é possível que a atividade antioxidante do óleo essencial da *S. aromaticum* esteja diretamente relacionada a este composto (BARBOZA et al, 2018). Em um estudo comparativo, Dawidowicz, Olszowy (2014) avaliaram a atividade antioxidante da *S. aromaticum* e do eugenol obtendo resultados similares, que corrobora para a associação do composto à ação antioxidante da *S. aromaticum*. A comprovação da atividade antioxidante pode servir de base para estudos futuros, nos quais se tenha a intenção de analisar a possível atividade antiinflamatória do óleo essencial da *S. aromaticum* (BARBOZA, et al 2018).

O óleo essencial da *S. aromaticum* representa uma fonte de compostos bioativos, com potencial para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, direcionadas ao controle do biofilme multiespécie da cavidade oral, cuja medida deve ser incentivada, afim de prevenir complicações geradas pela presença do mesmo, como a candidose oral, gengivite e cárie dentária (SILVA et al, 2017, BOWEN, 2018).

7 CONCLUSÃO

O óleo essencial da *S. aromaticum* inibe a formação do biofilme multiespécie oriundo da cavidade oral de forma similar à clorexidina, com efeitos significativos na cinética de crescimento celular, morfologia do biofilme e atividade metabólica. Tem como composto majoritário o eugenol, provável responsável pelas atividades antimicrobiana, antioxidante e metabólica.

8 REFERENCIAS:

- ADIL, M., et al. **Eugenol-induced suppression of biofilm-forming genes in *Streptococcus mutans*: An approach to inhibit biofilms.** *J Glob Antimicrob Resist.* v.2, n.4, p.286-292, 2014. Doi: 10.1016/j.jgar.2014.05.006
- AHMAD, A. et al. **In vitro synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical *Candida* isolates.** *Journal of Medical Microbiology.* v.59, p.1178–1184, 2010.
- AHMAD, A., et al. **Synergistic Interactions of Eugenoltosylate and Its Congeners with Fluconazole against *Candida albicans*.** *PLoS ONE.* v. 10, n.12, e0145053, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0145053
- ALBUQUERQUE, P., CASADEVALL, A. **Quorum sensing in fungi – a review.** *Med Mycol.* V.50, p. 337–45, 2012.
- ALMA, M. H., et al. **Chemical composition and content os essential oil from the bud of cultivated Turkish clove (*Syzygium aromaticum* L.).** *BioResources,* v. 2, n. 2, p. 265-269, 2007.
- ARABACI, T., et al. **Assessment of cytogenetic and cytotoxic effects of chlorhexidine digluconate on cultured human lymphocytes.** *Acta Odontol. Scan.* V. 71, n.5, p.1255-60, 2013. DOI: 10.3109/00016357.2012.757646.
- ARGENTA, S.C., et al. **MEDICINAL PLANTS: POPULAR CULTURE VERSUS SCIENCE.** *Vivências.* V.7, N.12: p.51-60, 2011
- BACHIEGA, T.F., et al. **Clove and eugenol in noncytotoxic concentrations exert immunomodulatory/anti-inflammatory action on cytokine production by murine macrophages.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology,* n. 64, p. 610–616, 2011. doi:10.1111/j.2042-7158.2011.01440.x
- BAKER, J.L. et al, **Ecology of the Oral Microbiome: Beyond Bacteria.** *Trends in Microbiology,* V. 25, N. 5, p. 362-374, 2017
- BAKHSI, M., et al. **Comparison of therapeutic effect of aqueous extract of garlic and nystatin mouthwash in denture stomatitis.** *Gerodontology;* v. 29, n. 2, p. 1–5, 2012. DOI:10.1111/j.1741-2358.2011.00544.x.
- BAMFORD, C.V., et al. ***Streptococcus gordonii* modulates *Candida albicans* biofilm formation through intergeneric communication.** *Infect. Immun.* V.77, p.3696 –3704, 2009.
- BANDARA, H.M.H.N., et al. **Future therapies targeted towards eliminating *Candida* biofilms and associated infections, Expert Review of Anti-infective Therapy.** V.15, n.3, p. 299-318, 2016. DOI: 10.1080/14787210.2017.1268530
- BANERJEE, M., et al. **Expression of UME6, a Key Regulator of *Candida albicans* Hyphal Development, Enhances Biofilm Formation via Hgc1- and Sun41-Dependent Mechanisms.** *Eukaryotic Cell,* v.12, n.2, p. 224 –232, 2013. DOI: 10.1128/EC.00163-12

BARBOSA, V. L. S. A., et al. **Bibliometric Study of Dental Research on Herbal medicines.** *Rev. bras. Ciênc. saúde*, v. 16, n. 2, p. 123-130, 2012.

BARBOZA, J.N., et al. **An Overview on the Anti-inflammatory Potential and Antioxidant Profile of Eugenol.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, V. 2018, Article ID 3957262, 9 p, 2018. DOI /10.1155/2018/3957262

BELSTROM, D. **Temporal stability of the salivary microbiota in oral health.** *PLoS One*. V. 11, e0147472, 2016

BESRA, M.M, KUMAR, V. **In vitro investigation of antimicrobial activities of ethnomedicinal plants against dental caries pathogens,** *N. Biotech*, v.8, p.257, 2018. DOI: /10.1007/s13205-018-1283-2

BOWEN, W.H. **Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments.** *Trends in Microbiology*. v. 26, n. 3, p. 229,242, 2018. doi: 10.1016/j.tim.2017.09.008

BRASIL, Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais.** Brasília: Ministério da Saúde; 2012.

BROWN G.D., et al. **Hidden killers: human fungal infections.** *Sci Transl Med*, v.4, n.165, 165rv13, 2012. DOI: 10.1126/scitranslmed.3004404.

BUDRI, P.E., et al, **Effect of essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* and their major components on biofilm production in *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with mastites.** *Journal of Dairy Science*. V. 98 N. 9, 2015. DOI:10.3168/jds.2015-9442

BUDZYŃSKA, A., et al. **Enzymatic profile, adhesive and invasive properties of *Candida albicans* under the influence of selected plant essential oils.** *Acta Biochim Pol.* v.61, n.1, p.115-21, 2014

BUDZYŃSKA, A., et al. ***Candida albicans*/*Staphylococcus aureus* Dual-Species Biofilm as a Target for the Combination of Essential Oils and Fluconazole or Mupirocin.** *Mycopathologia*. v.182, e.11-12, p.989-995, 2017. doi: 10.1007/s11046-017-0192-y

BURMOELLE, M., et al. **Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter?** *Trends in Microbiology*. v. 22, n. 2, p. 84-91, 2014

CANABARRO, C., et al, **Association of subgingival colonization of *Candida albicans* and other yeasts with severity of chronic periodontitis,** *J. periodontal. res.* v.48, n. 4, p. 428–432, 2013

CAVALCANTI, Y. W., et al, **Three-species biofilm model for the evaluation of enamel and dentin demineralization,** *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, v.30, n.5, p. 579-588, 2014 DOI: 10.1080/08927014.2014.905547

CERQUEIRA, M.D. et al, **Variação Sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg (Myrtaceae).** *Quimica nova*, v. 32, n.6, p. 1544- 1548, 2009

CHAIEB, K., et al. **The chemical composition and biological activity of clove essential oil. *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review.** *Phytother Res.* V. 21, p. 501—6, 2007

CHANDRA, J. et al. **Antifungal resistance of *Candida* biofilms formed on denture acrylic *in vitro*.** *Journal of dental research,* v.80, n.3, p. 903-908, 2001

CHAPPLE, I.L., et al. **Interaction of lifestyle, behaviour or systemic diseases with dental caries and periodontal diseases: consensus report of group 2 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases.** *J Clin Periodontol.* V.44, n. 18, p.39–51, 2017.

CHINSEMBU, K.C. **Plants and other natural products used in the management of oral infections and improvement of oral health.** *Acta Tropica.* V.154, p. 6-18, 2016. DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.10.019

CLEVELAND, A. A. et al. **Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008-2013: results from population-based surveillance.** *PLoS ONE.* V.10, e0120452, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts - CLSI M27-A3,** Wayne, PA, USA, v.28, n.14, p. 13, 2008

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. M07-A8,** Wayne, PA, USA, v. 29, n. 1, 2009.

COSTALONGA, M., HERZBERG, M.C. **The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries,** *Immunol. Lett.* V.162, N.2, P. 22-38, 2014.

CUI, L. **The human mycobiome in health and disease.** *Genome Med.* V.5, n.63, 2013

D'ARGENIO, V., SALVATORE, F. **The role of the gut microbiome in the healthy adult status.** *Clin Chim Acta,* v. 451, p.97-102, 2015 (in press). DOI: 10.1016/j.cca.2015.01.003

DA COSTA, L.F.N.P., et al. **Chlorhexidine mouthwash as an adjunct to mechanical therapy in chronic periodontitis: A meta-analysis.** *J Am Dent Assoc.* v.148, n.5, p.308-318, 2017. DOI: 10.1016/j.adaj.2017.01.021

DA SILVA, W.J. **Exopolysaccharide Matrix of Developed *Candida albicans* Biofilms After Exposure to Antifungal Agents.** *Braz Dent J.* V. 23, N.6, P. 716-722, 2012

DA SILVA, W.J., et al **Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms.** *Braz Dent J.*v.19, p.364-369, 2008

DANCZAK, R.E. et al. **Members of the Candidate Phyla Radiation are functionally differentiated by carbon- and nitrogen-cycling capabilities.** *Microbiome.* V. 2,n.1, p.112.DOI: 10.1186/s40168-017-0331-1

DE LA FUENTE-NÚÑEZ C., et al. **Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies.** Curr Opin Microbiol. V.16, p. 580–589, 2013. DOI: 10.1016/j.mib.2013.06.013

DELHAES L. **The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community – implications for therapeutic management.** PLoS One. V.7, e36313, 2012

DAHAM, S.S., et al **The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*.** Molecules. v.20, n.7, p.11808-29, 2015. doi: 10.3390/molecules200711808.

DAS, B., et al. **Eugenol provokes ROS-mediated membrane damage-associated antibacterial activity against clinically isolated multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains.** Infect Dis (Auckl), V. 9, n.11, 2016.

DAWIDOWICZ, A.L., OLSZOWY, L **Does antioxidant properties of the main component of essential oil reflect its antioxidant properties? The comparison of antioxidant properties of essential oils and their main components,** Natural Product Research, v. 28, n. 22, p. 1952–1963, 2014.

DE-LA-TORRE, J., et al. **Caries and *Candida* colonisation in adult patients in Basque Country (Spain).** Mycoses. v.59, p.234-240, 2016. DOI: 10.1111/myc.12453.

DEWHIRST, F.E., et al, **The human oral microbiome.** J Bacteriol., n. 192, p.5002–5017, 2010

DIAZ, P. I., et al **Synergistic interaction between *Candida albicans* and commensal oral streptococci in a novel in vitro mucosal model.** Infection and Immunity. V. 80, p. 620–632, 2012.

DIAZ, P. I., **Microbial diversity and interactions in subgingival biofilm communities.** Frontiers of Oral Biology. v. 15, p. 17–40, 2012

DIAZ, P.I., et al. **Fungal bacterial interactions and their relevance to oral health: linking the clinic and the bench.** Front Cell Infect Microbiol, v. 4, n.101, 2014

DUARTE, M.C.T., et al **Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against epec and etec *Escherichia coli*.** Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.8, n.esp., p.139-143, 2006.

DUPUY, A. K., **Redefining the human oral mycobiome with improved practices in amplicon-based taxonomy: discovery of *Malassezia* a prominent commensal.** PLoS One. v. 9, e90899, 2014

EDLUND, A. **An in vitro biofilm model system maintaining a highly reproducible species and metabolic diversity approaching that of the human oral microbiome.** Microbiome, v. 1, n. 25, 2013

EDLUND, A. **Meta-omics uncover temporal regulation of pathways across oral microbiome genera during in vitro sugar metabolism.** ISME J. n.9, p. 2605–2519,

2015

FALSETTA, M.L. et al. **Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo.** Infect. Immun. V.82, p.1968–1981, 2014

FERNANDES, T., et al. **Current and novel approaches for control of dental biofilm.** International Journal of Pharmaceutics. V. 536, p.199–210, 2018. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.11.019

FIGUEIREDO, L.C., et al. **Ação antimicrobiana de extratos vegetais sobre a microbiota da placa dentária e saliva: estudo *in vitro*.** Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo, v.16, pp. 15-20, 2004.

FILGUEIRAS, C.T., VANETTI, M.C.D. **Effect of eugenol on growth and listeriolysin O production by *Listeria monocytogenes*.** Braz Arch Biol Technol v.49, p.405–9, 2006.

FLEMMING, H.C. et al. **Biofilms: an emergent form of bacterial life.** Nat. Rev. Microbiol. V.14, p.563–575, 2016

FRAGKOU, S., et al. ***Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Candida albicans* in oral samples from caries-free and caries-active children.** Eur Arch Paediatr Dent. v. 17, p. 367-375, 2016.

FURUKAWA, H., et al. **Ferulic acid production from clove oil by *Pseudomonas fluorescens* E118.** J Biosci Bioengg. v.96, n.4, p.404–405, 2003

GARCIA-CUESTA. C., et al. **Current treatment of oral candidiasis: a literature review.** J Clin Exp Dent. V. 6, e-576–e582, 2014

GARRETT, T.R., et al. **Bacterial adhesion and biofilms on surfaces.** Prog Nat Sci. v. 18, p.1049-56, 2008.

GHANNOUM, M.A. **Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals.** PLoS Pathog. v.6, e1000713, 2010

GHEDIRA, K., et al. ***Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae) Giroflor.** Phytotherapie, v.8, p. 37-43, 2010

GUPTA, A., et al. **Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of *Syzygium aromaticum*, *Ocimum sanctum* and *Cinnamomum zeylanicum* plant extracts against *Enterococcus faecalis*: a preliminary study.** International Endodontic Journal, v. 46, p. 775–783, 2013. DOI: 10.1111/iej.12058

HALDER, S. et al. **Essential Oil of Clove (*Eugenia caryophyllata*) augments the Humoral Immune Response but Decreases Cell Mediated Immunity.** Phytotherapy research. v. 25, p. 1254–1256, 2011. DOI: 10.1002/ptr.3412

HALDER, S., et al. **Acute effect of essential oil of *Eugenia caryophyllata* on cognition and pain in mice.** Arch Pharmacol. n. 385, p. 587–593, 2012

HASSAN, H.A., et al. **Topical Eugenol Successfully Treats Experimental *Candida***

- albicans-Induced Keratitis.** Ophthalmic Research. v.60, n.2, 2018 DOI: 10.1159/000488907
- HEMAISWARYA, S., DOBLE, M., **Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria.** Phytomedicine. V.16, p.997_1005. 2009
- HERNÁNDEZ-OCHOA, L., et al. **Study of the antibacterial activity of chitosan-based films prepared with different molecular weights including spices essential oils and functional extracts as antimicrobial agents.** Rev. Mex. Ing. Quim. V.10, p.455–463, 2011
- HERRERA, D., et al. **Local and Systemic Antimicrobial Therapy in Periodont J** Evid Base Dent Pract. v. 12, n.1, p. 50-60, 2012
- HOBLEY, L. et al. **Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes.** FEMS Microbiol. Rev. v.39, p. 649–669, 2015
- HOLETZ, F.B. et al. **Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases.** Mem Inst Oswaldo Cruz, V. 97, n.7, p. 1027-1031, 2002
- HOPKINS, M. J. et al. **Degradation of cross-linked and non-cross-linked arabinoxylans by the intestinal microbiota in children.** Appl. Environ. Microbiol. V.69, p.6354–6360, 2003.
- HORNBY, J.M., et al. **Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol.** Appl Environ Microb. v. 67, p. 2982–2992, 2001.
- HOSHI, N., et al. **Management of oral candidiasis in denture wearers.** Journal of Prosthodontic Research; v. 55, n. 1, p. 48–52, 2011. DOI: 10.1016/j.jpor.2010.03.004.
- HOW, K.Y., et al. ***Porphyromonas gingivalis*: an overview of periodontopathic pathogen below the gum line.** Front Microbiol. v.9, n.7, p. 53, 2016
DOI:10.3389/fmicb.2016.00053
- HWANG, G., et al. ***Candida albicans* mannans Mediate *Streptococcus mutans* exoenzyme GtfB binding to modulate cross-kingdom biofilm development *in vivo*.** PLoSPathog. v. 13, e-1006407, 2017
- HYLDGAARD, M., et al. **Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components.** Front Microbiol. v. 3, p.12, 2012
- IGIC, M. et al. **Chronic gingivitis: the prevalence of periodontopathogens and therapy efficiency,** Eur J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. v.31, n. 8, p. 1911–1915, 2012.
- ISMAIL, M. et al. **Chemical composition, antibiotic promotion and *in vivo* toxicity of *Piper nigrum* and *Syzygium aromaticum* essential oil.** African Journal of Biochemistry Research. v.11, n.10, p. 58-71, 2017. DOI: 10.5897/AJBR2017.0955

- JACOBSEN, I.D., et al. **Candida albicans dimorphism as a therapeutic target.** Talking Democracy, v. 10, n. 1, p. 85–93, 2012. DOI: 10.1586/eri.11.152
- JAFRI, H., et al. **In vitro efficacy of eugenol in inhibiting single and mixed-biofilms of drug-resistant strains of Candida albicans and Streptococcus mutans.** *Phytomedicine*. v. 15, n. 54, p.206-213, 2018. doi: 10.1016/j.phymed.2018.10.005.
- JANNUS, M.M. **Candida albicans in multispecies oral communities; a key stone commensal?** *Adv. Exp.Med.Biol.* v.931, P.13–20, 2016
- JEFFERSON, K.K. **What drives bacteria to produce a biofilm?** *FEMS Microbiol. Lett.* V.236, p.163–173, 2004
- JIROVETZ, L., et al. **Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil.** *J Agric Food Chem.* v.54, n.17, p. 6303-6307, 2006
- JONSSON, D., et al, **Gingival tissue transcriptomes in experimental gingivitis.** *J Clin Periodontol.* V. 38, p. 599 – 611, 2011. DOI:10.1111/j.1600-051X.2011.01719.x.
- KALLIO, K.A., et al. **Lipopolysaccharide associates with pro-atherogenic lipoproteins in periodontitis patients.** *Innate Immunity.* v. 14, p.247-253, 2008. DOI: 10.1177/1753425908095130
- KAMATOU, G.P., et al. **Eugenol from the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule.** *Molecules.* V. 17, p.6953-8, 2012
- KAMPF, G. **Acquired resistance to chlorhexidine—is it time to establish an ‘antiseptic stewardship’ initiative?** *J Hosp Infect.* v. 94, P.213–227, 2016
- KASSEBAUM, N.J., et al. **Global burden of severe tooth loss: a systematic review and meta-analysis.** *J Dent Res.* v. 93, p..20– 28, 2014.
- KATHARIOS-LANWERMEYER, S., et al. **Mini-review: microbial coaggregation: ubiquity and implications for biofilm development.** *Biofouling.* v.30, p.1235–1251, 2014
- KHAN, M.S.A., AHMAD, I. **Biofilm inhibition by Cymbopogon citratus and Syzygium aromaticum essential oils in the strains of Candida albicans.** *Journal of Ethnopharmacology.* v. 140, p. 416– 423, 2012. DOI: 10.1016/j.jep.2012.01.045
- KHAN, R., et al. **Antibacterial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin.** *Molecules.* V.14, P.586–97, 2009.
- KILIAN, M, et al. **The oral microbiome an update for oral healthcare professionals.** *Br Dent J.* v. 221, n. 10, p.657–666, 2016
- KIM, D. et al. **Candida albicans stimulates Streptococcus mutans microcolony development via cross-kingdom biofilm-derived metabolites.** *Sci. Rep.* v.7, p.41332, 2017

KIM, J.Y. **Human fungal pathogens: why should we learn?** *J. Microbiol.* v.54, p.145–148, 2016 DOI: 10.1007/s12275-016-0647-8.

KLINGSPOR, L., et al. (2015). **Invasive Candida infections in surgical patients in intensive care units: a prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2006-2008).** *Clin. Microbiol. Infect.* V.21, n.1, p. 87. DOI: 10.1016/j.cmi.2014.08.011

KOLENBRANDER, P.E. **Multispecies communities: interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source.** *International Journal of Oral Science* v.3, p.49–54, 2011.

KOLENBRANDER, P.E., et al. **Communication among oral bacteria.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v. 66, p.486–505, 2002.

KOUIDHI, B., et al. **Molecular detection of bacteria associated to dental caries in 4–12-year-old Tunisian children.** *Microbial Pathogenesis*, v.71–72, p.32–36, 2014. DOI: 10.1016/j.micpath.2014.04.008

KRAGH, K.N., et al., **Polymorphonuclear leukocytes restrict the growth of Pseudomonas aeruginosa in the lungs of cystic fibrosis patients,** *Infect. Immun.* V.82, N.11, P.4477-86, 2014.doi: 10.1128/IAI.01969-14

KRISHNAN, K., CHEN, T., PASTER, B. et al. **A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease.** *Oral Dis.* V.23, n.3, p.276–286, 2017

KULLBERG B.J., ARENDRUP M.C. **Invasive candidiasis.** *N. Engl. J. Med.* v.373, n.15, p.1445–1456, 2015.

KUMAR, A., et al. **Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens.** *International Journal of Medical Microbiology.* V. 307, p. 481–489, 2017. DOI: 10.1016/j.ijmm.2017.09.016

LABIB, G.S. ALDAWSARI, H. **Innovation of natural essential oil-loaded Orabase for local treatment of oral candidiasis.** *Drug Des Devel Ther.*v. 9, p.3349–3359. 2015. doi:10.2147/DDDT.S85356

LALLA R.V., et al. **A systematic review of oral fungal infections in patients receiving cancer therapy.** *Support Care Cancer.* V.18, n.8, p.985–92, 2010.DOI:10.1007/s00520-010-0892-z

LARSEN, T., FIEHN, N-E. **Dental biofilm infections – an update.** *APMIS.* V. 125, p. 376–384, 2017. DOI 10.1111/apm.12688

LATIFAH-MUNIRAH, B., et al. **Eugenol, an essential oil of clove, causes disruption to the cell wall of Candida albicans (ATCC 14053).** *Frontiers in Life Science*, v.8, n.3 2015. DOI: 10.1080/21553769.2015.1045628

LI, K., et al. **Analyses of the stability and core taxonomic memberships of the human microbiome.** *PLoS ONE.* V.8, e63139, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0063139

LIMBERGER, R. P., et al. **Óleos voláteis de espécies de *myrcia* nativas do rio grande do sul.** Quimica Nova. V. 27, N. 6, p. 916-919, 2004.

LOZANO MORAGA, C.P., et al. **Prevalence of *Candida albicans* and carriage of *Candida non-albicans* in the saliva of preschool children, according to their caries status.** Acta Odontol Scand, v. 75, p. 30-35, 2017.

ŁUKASZUK et al. **Retrospective observation of drug susceptibility of *Candida* strains in the years 1999, 2004, and 2015.** PeerJ, n. 5, p.3038, 2017. DOI 10.7717/peerj.3038

MACHADO, F. C. et al. **Antifungal activity of chlorhexidine on *Candida* spp. biofilm.** Rev Odontol UNESP, v. 39, n. 5, p. 271-275, 2010.

MANSOURIAN, A. et al. **The comparative study of antifungal activity of *Syzygium aromaticum*, *Punica granatum* and nystatin on *Candida albicans*; An in vitro study.** Journal de Mycologie Médicale, 2014. DOI: 10.1016/j.mycmed.2014.07.001 2

MARCENES, W., et al. **Global burden of oral conditions in 1990–2010: a systematic analysis.** J Dent Res. V.92, p.592–7, 2013

MARCHESAN, J.T., et al. **Interdental Cleaning Is Associated with Decreased Oral Disease Prevalence.** Journal of Dental Research. V., 00, n.0, p. 1-6, 2018. DOI: 10.1177/0022034518759

MARSH, P.D. **Dental plaque as a biofilm: the significance of pH in health and caries.** Compend Contin Educ Dent. V. 30, n. 2, p. 76-83, 2009.

MARSH, P.D., et al. **Ecological approaches to oral biofilms: control without killing.** Caries Res v.49, n. 1, p.46–54, 2015.

MARSH, P.D., ZAURA, E. **Dental biofilm: ecological interactions in health and disease.** J. Clin. Periodontol. N. 44, s. 18, p.12–22, 2017

MATOS, A.O., et al. **Three-species biofilm model onto plasma-treated titanium implant surface.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. V.152, p.354–366, 2017

McBAIN, A. J., et al. **Effects of a chlorhexidine gluconate-containing mouthwash on the vitality and antimicrobial susceptibility of in vitro oral bacterial ecosystems.** Appl. Environ. Microbiol. V.69, p. 4770–4776, 2003.

McBAIN, A. J., MAcFARLANE, G. T. **Modulation of genotoxic enzyme activities by non-digestible oligosaccharide metabolism in in-vitro human gut bacterial ecosystems.** J. Med. Microbiol. V.50, p. 833–842, 2001.

McCARTY T. P., PAPPAS P. G. **Invasive candidiasis.** J. Infect. Dis. Clin. North Am. V.30, p. 103–124, 2016.

MOON, S.E. et al. **Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria.** Archives of Oral Biology. v.56, n.9, p. 907- 916, 2011. Doi:10.1016/j.archoralbio.2011.02.005

MOSCA, V.P., LOIOLA, M.V.I.B. **Uso popular de plantas medicinais no rio grande do norte, nordeste do brasil.** Revista Caatinga. V.22, n.4, p.225-234, 2009.

MOYNIHAN, P.J., KELLY, S.A. **Effect on caries of restricting sugars intake: systematic re-view to inform WHO guidelines.** J. Dent. Res. V.93, N. (1):8–18. <https://doi.org/10.1177/0022034513508954>

MUSTHAFA, K.S., et al. **Antifungal potential of eugenyl acetate against clinical isolates of *Candida* species.** Microb Pathog. v.99, p.19-29, 2016. doi: 10.1016/j.micpath.2016.07.012.

NAIR, R.G., et al. **The effect of oral bacteria on *Candida albicans* germ-tube formation.** APMIS. V.109, p.147–154, 2001.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. **Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014.** Journal of Natural Products, v.79, n.3, p. 629-661, 2016 DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b01055

NOBBS, A. H., JENKINSON, H. F. **Interkingdom networking within the oral microbiome.** Microbes and Infection. V. 17, p. 484–492, 2015

OLIVEIRA, N.M. et al. **Biofilm formation as a response to ecological competition.** PLoS Biol. V.13, e1002191, 2015

OLIVEIRA, R.A., et al. **Óleos essenciais: perspectivas para o agronegócio de especiarias na Bahia.** *Bahia*. Agrícola, v. 8, n. 1, p. 46-48, 2007.

OLSEN, I. **From the Acta Prize Lecture 2014: the periodontal-systemic connection seen from a microbiological standpoint.** Acta Odontologica Scandinavica v.73, p.563 568, 2015. DOI: 10.3109/00016357.2015.1007480

PAMMI M, et al. **Polymicrobial bloodstream infections in the neonatal intensive care unit are associated with increased mortality: a case-control study.** BMC Infect Dis. N. 14:390, 2014. DOI: 10.1186/1471-2334-14-390

PANG, S.Y.M, et al. **Inhibition of the growth of pathogenic *Candida* spp. by salicylhydroxamic acid.** Int J BiolLife Sci. v.7, p.1–7, 2011.

PAPPAS P.G., et al. **Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America.** Clin. Infect. Dis. V.62, n.4, e1–e50, 2016.

PASTER, B.J., et al. **The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites.** Periodontol 2000, v. 2006, n.42, p. 80-7, 2006

PEREZ-ROSES, R., et al. **Biological and nonbiological antioxidant activity of some essential oils.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 64, n. 23, p. 4716–4724, 2016.

PETERS, B.M., et al. **Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease.** Clin Microbiol Rev. v. 25, p.193–213, 2012.

PFALLER M.A., DIEKEMA D.J. **Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem.** Clin Microbiol Rev, v.20, p.133-163, 2007

PIHLSTROM, B.L., et al. **Periodontal diseases,** Lancet. V. 366, n. 9499, p.1809-20, 2005.

PINTO, E. et al, **Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species.** Journal of Medical Microbiology. N. 58, p. 1454–1462, 2009. DOI 10.1099/jmm.0.010538-0

PITTS, N.B. et al. **Dental caries.** Nat. Rev. Dis. Primers 3, n.17030, 2017

PLATINGA, N.L., et al. **Oral mucosal adverse events with chlorhexidine 2% mouthwash in ICU.** Intensive Care Med. V. 42, p. 620–621, 2016

POLKE, M., et al. **Candida survival strategies.** Advances in Applied Microbiology. v. 91, p. 139-235, 2015. DOI: 10.1016/bs.aambs.2014.12.002

PRATTEN, J., et al. **Characterization of in vitro oral bacterial biofilms by traditional and molecular methods.** Oral Microbiol Immunol. V.18, N.1, P.45-49, 2003

RADÜNZ, M., et al. **Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil,** *Food Chemistry*, v.15, p.180-186, 2019 doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.173>

RAJKOWSKA, K., et al. **Candida albicans Impairments Induced by Peppermint and Clove Oils at Sub-Inhibitory concentrations.** Int J Mol Sci. v.18, n.6, p.1307, 2017 doi: 10.3390/ijms18061307

RAJPUT, J.D., et al. **Perspectives on medicinal properties of natural phenolic monoterpenoids and their hybrids.** Molecular Diversity, v. 22, n. 1, p. 225–245, 2018.

RICKER, A., et al. ***Streptococcus gordonii* glucosyltransferase promotes biofilm interactions with *Candida albicans*.** J Oral Microbiol. N. 6, p. 23419, 2014

ROBERTS, F. A., DARVEAU, R. P. **Microbial Protection and Virulence in Periodontal Tissue as a Function of Polymicrobial Communities: Symbiosis and Dysbiosis.** Periodontology 2000, v.69, n.1, p. 18–27, 2015. DOI: 10.1111/prd.12087

ROCHA, E.A.L.S.S. et al. **Atividade antimicrobiana “in vitro” de extratos hidroalcoólicos de plantas medicinais do nordeste brasileiro em bactérias do gênero *Streptococcus*.** Pesq Bras Odontoped Clin Integ, v. 13, n. 2, p. 233-238, 2013.

RODER, H.L. et al. **Studying Bacterial Multispecies Biofilms: Where to Start?.** Trends in Microbiology, V. 24, N. 6, 2016. DOI: 10.1016/j.tim.2016.02.019

RODRIGUEZ, O.E., et al. **Obtaining of the essential oil of *Syzygium aromaticum*, identification of eugenol and its effect on *Streptococcus mutans*.**, J. Oral Res. N. 3, p. 218–224, 2014

- RUDICK, C.P., et al. **Triggering receptor expressed on myeloid cells in the pathogenesis of periodontitis: potential novel treatment strategies**, Expert Review of Clinical Immunology, v.13, n.12, p.1189-1197, 2017.
DOI:10.1080/1744666X.2017.1392855
- SÁ, R.C.S., et al. **A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils**. Molecules, V.19, n. 2, p. 1459–1480, 2014.
- SANTOS, E.B., et al. **Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil**. Brazilian Journal of Pharmacognosy. V. 19, n.1B, p. 321-324, 2009
- SANTOS, J. S., et al. **Beneficial effects of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan extract on the inflammatory and nociceptive responses in rodent models**. Journal of Ethnopharmacology, v.148, n. 1, p.218–222, 2013. DOI: 10.1016/j.jep.2013.04.012
- SARDI, J.C.O., et al. **Candida species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options**. Journal of Medical Microbiology; v. 62, p. 10–24, 2013. DOI:10.1099/jmm.0.045054-0.
- SCHERER, R, GODOY, H. T. **Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method**. Food Chemistry. v.112, p. 654–658, 2009.
Doi:10.1016/j.foodchem.2008.06.026
- SCHRODER, S.A., et al. **Is parotid saliva sterile on entry to the oral cavity?** Acta Otolaryngol. v.137, n.7, p.762-764, 2017. DOI: 10.1080/00016489.2016.1272002
- SCHWIERTZ, A. **Microbiota of the human body: implications in health and disease**, Adv. Exp. Med. Biol., p. 45–60, 2016.
- SCOTT, M.G., et al. **An antiinfective peptide that selectively modulates the innate immune response**. Nat Biotechnol. V. 25, p. 465–472., 2007
- SEED, P.C. **The human mycobiome**. Cold Spring Harb. Perspect. Med. V. 5, a019810, 2015
- SELEEM, D., et al. **In Vitro and In Vivo antifungal Activity of Lichochalcone-A against Candida albicans Biofilms**. PLoS ONE. v 11, n.6: e0157188, 2016.
doi:10.1371/ journal.pone.0157188
- SENADHEERA, M.D., et al. **Signal transduction system in Streptococcus mutans affects gtfBCD, gbpB, and ftf expression, biofilm formation, and genetic competence development**. J Bacteriol. v.12, p.4064–76, 2005.
- SHIRTLIFF, M.E., et al. **Cross-kingdom interactions: Candida albicans and bacteria**. FEMS Microbiol Lett. V.299, P. 1–8, 2009 DOI:10.1111/j.1574-6968.2009.01668.x
- SIDDIQUI, Z.N. et al. **Synthesis characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives**. Journal of Saudi Chemical Societ. v.2, p.237-234,2013.
- SILVA, M.S.P.S. et al. **Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid northeast: contribution to the control of oral microorganisms**. Evid Based Complement Alternat Med, v. 2012, 2012.

SILVA, S., et al. **Candida Species Biofilms' Antifungal Resistance**, J. Fungi, v. 3, n. 8; 2017. DOI:10.3390/jof3010008

SILVERMAN, R.J., et al. **Interaction of Candida albicans cell wall Als3 protein with Streptococcus gordonii SspB adhesin promotes development of mixed-species communities**. Infect Immun. V.78, p.4644–4652, 2010.

SILVESTRI, J.D.F., et al. **Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.)**. Revista Ceres Viçosa, Vol. 57, No 5: 589-594, 2010.

SIMÓN-SORO, A., MIRA, A. **Solving the etiology of dental caries**. Trends Microbiol. v. 23, p. 76-82, 2015.

SIQUEIRA, W.L., et al. **New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle**. J Dent Res. V.91, p.1110–8, 2012.

SOUZA B.M., et al. **Antimicrobial and Anti-Caries Effect of New Glass Ionomer Cement on Enamel Under Microcosm Biofilm Model**. Brazilian Dental Journal. v.29, n.6, p.599-605, 2018. DOI: 10.1590/0103-6440201802163

STROLLO S., et al. **Epidemiology of hospitalizations associated with invasive candidiasis, United States, 2002–2012**. Emerg. Infect. Dis. V.23, p.7–13, 2016.

SUTHERLAND, I.W. **The biofilm matrix e an immobilized but dynamic microbial environment**. Trends Microb v.9, p.222-7, 2001.

SWIDERGALL, M., FILLER, S.G. **Oropharyngeal Candidiasis: Fungal Invasion and Epithelial Cell Responses**. PLoS Pathog. v. 13, n.1, e1006056, 2017. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006056

SZTAJER, H. **Cross-feeding and interkingdom communication in dual-species biofilms of Streptococcus mutans and Candida albicans**. ISME J. v.8, p.2256–2271, 2014

TAKAHASHI, N., NYVAD, B. **The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives**. J. Dent. Res. N. 90, p. 294–303, 2011

TAM, K., et al. **Real-time monitoring of Streptococcus mutans biofilm formation using quartz crystal microbalance**. Caries Res v.41, p.474–83, 2007

TAMAI, R., et al. **Candida albicans enhances invasion of human gingival epithelial cells and gingival fibroblasts by Porphyromonas gingivalis**. Microb Pathog. V. 51, p.250–254, 2011.

THEIN, Z.M., et al. **Effect of oral bacteria on growth and survival of Candida albicans biofilms**. Arch Oral Biol. V.51, p.672–680, 2006.

THOSAR, N. et al. **Antimicrobial efficacy of five essential oils against oral pathogens: an in vitro study**. Eur J Dent. V. 7, p. 71, 2013.

TIAN, J., et al. **Microbiome interaction with sugar plays an important role in relapse of childhood caries.** Biochem. Biophys. Res. Commun. V.468, n.1–2, p.294–299, 2015. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.10.110.

UPPULURI, P., CHAFFIN, W.L. **Defining *Candida albicans* stationary phase by cellular and DNA replication, gene expression and regulation.** Molecular Microbiology. V.64, N.6, P.1572–1586, 2007. DOI:10.1111/j.1365-2958.2007.05760.x

VARONI, E., et al. **Chlorhexidine (CHX) in dentistry: State of the art.** Minerva Stomatologica, v.61, n.9, p. 399–419, 2012.

VIANA, G.R., et al. **Chlorhexidine spray as an adjunct in the control of dental biofilm in children with special needs.** Spec Care Dentist. v. 34, n.6, p. 286-290, 2014. DOI: 10.1111/scd.12069

WADE, W.G. **The oral microbiome in health and disease,** Pharmacol. Res. v.69, n. 1, p.137–143, 2013.

WALKER, L.A, et al.. **Elevated chitin content reduces the susceptibility of *Candida* species to caspofungin.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy; v. 57, n. 1, p. 146 - 154, 2013. <https://doi.org/10.1128/AAC.01486-12>

WALL G., et al. ***Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis.** Current Opinion in Microbiology. V.52, p.1–6, 2019. DOI: 10.1016/j.mib.2019.04.001

WALMIKI, M.R., RAI, V.R. **Cell Attachment Inhibition and Anti-biofilm Activity of *Syzygium aromaticum*, *Cuminum cyminum* and *Piper nigrum* Essential Oils Against Pathogenic Bacteria,** Journal of Essential Oil Bearing Plants, v.20, N.1, P. 59-68, 2017 DOI: 10.1080/0972060X.2017.1287011

WANG H., et al. **Epidemiology of candidemia and antifungal susceptibility in invasive *Candida* species in the Asia-Pacific region.** Future Microbiol. v. 11, n.11, p. 1461–1477, 2016. DOI: 10.2217/fmb-2016-0099

WILLEMS, H.M. et al. ***Candida albicans* in oral biofilms could prevent caries.** Pathog. Dis. V. 74, 2016. DOI: 10.1093/femspd/ftw039

WILLIAMS, D., LEWIS, M. **Pathogenesis and treatment of oral candidosis.** Journal of Oral Microbiology, v.3, p.1–11, 2011. DOI:10.3402/jom.v3i0.5771

WOLCOTT, R., et al. **The polymicrobial nature of biofilm infection.** Clin Microbiol Infect v. 19, p.107–112, 2013.

WONG, S. S. W., et al. **In pursuit of the ideal antifungal agent for *Candida* infections: High-throughput screening of small molecules.** Drug Discovery Today, v.19, p.1721–1730, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.06.009>

WRIGHT, C.J., et al. **Microbial interactions in building of communities.** Molecular Oral Microbiology. V.28, p. 83–101, 2013

XU, H., et al. **Innocent until proven guilty: mechanisms and roles of Streptococcus–Candida interactions in oral health and disease.** *Molecular Oral Microbiology*. v. 29, p. 99–116, 2014. DOI: 10.1111/omi.12049

XU, H., et al. **S. oralis activates the Efg1 filamentation pathway in C. albicans to promote cross-kingdom interactions and mucosal biofilms.** v. 6, n. 3, 2017 DOI: 10.1080/21505594.2017.1326438

XU, H., et al. **Streptococcus oralis and Candida albicans synergistically activate μ -calpain to degrade E-cadherin from oral epithelial junctions.** *J. Infect. Dis.* V.214, n. 6, p. 925–934, 2016. DOI: 10.1093/infdis/jiw201

YADAV, A.S., BHATNAGAR, D. **Free radical scavenging activity, metal chelation and antioxidant power of some of the Indian spices.** *Biofactors*. V.31, P.219-27, 2007.

YOO, H.J., JWA, S.K. **Inhibitory effects of β -caryophyllene on Streptococcus mutans biofilm.** *Arch Oral Biol*. v.88, P.42-46, 2018. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.01.009.

ZAURA, E., TEN CATE, J. M., **Towards Understanding Oral Health.** *Caries Research*, v.49, n.1, p. 55–61, 2015. DOI: 10.1159/000377733

ZHANG, Y. **Human oral microbiota and its modulation for oral health.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*. V.9, p. 883–893, 2018. DOI : 10.1016/j.biopha.2018.01.146