

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

LIVIA CÂMARA DE CARVALHO GALVÃO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS CONTRA MICRORGANISMOS DO GRUPO MUTANS E
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Marta Cristina Teixeira Duarte

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Livia Câmara de Carvalho Galvão, e orientada pelo Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen.

Assinatura do Orientador

PIRACICABA
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

G139a Galvão, Livia Câmara de Carvalho, 1985-
Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos
essenciais contra microrganismos do grupo mutans e
determinação da atividade antiproliferativa / Lívia Câmara
de Carvalho Galvão. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Pedro Luiz Rosalen.
Coorientador: Marta Cristina Teixeira Duarte.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. *Streptococcus mutans*. 2. Biofilme. I. Rosalen, Pedro Luiz,
1960- II. Duarte, Marta Cristina Teixeira. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Antimicrobial activity of essential oils on mutans Streptococci and
determination of their antiproliferative effect

Palavras-chave em Inglês:

Streptococcus mutans

Biofilm

Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca examinadora:

Pedro Luiz Rosalen [Orientador]

Regiane Yatsuda

Carina Denny

Data da defesa: 27-02-2012

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 27 de Fevereiro de 2012, considerou o candidato LÍVIA CÂMARA DE CARVALHO GALVÃO aprovado.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Pedro Luiz Rosalen".

Prof. Dr. PEDRO LUIZ ROSALEN

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Regiane Yatsuda".

Profa. Dra. REGIANE YATSUDA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Carina Denny".

Profa. Dra. CARINA DENNY

Dedico este trabalho ao meu avô Jairo por representar tudo de mais valioso que existe em minha vida e por todo apoio que sempre me deu.

Aos meus pais Mytsi e Raimundo, minhas irmãs, Thais e Mirza, e minha avó Nazaré pelo amor incondicional e por serem os responsáveis por eu ser quem sou.

Aos meus avós, Socorro e Raimundo, que são meus anjos da guarda e guiam meus passos rumo à realização dos meus sonhos.

Ao Kaio, meu namorado, por todo amor, por ser meu ponto de equilíbrio e por me fazer ser uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen, meu orientador, por todos os ensinamentos científicos que me foram passados, às horas despendidas e, principalmente, pelo que me ensinou por meio do seu exemplo de vida, me fazendo perceber que é possível crescer ajudando as pessoas. Muito obrigada pela paciência, dedicação e amizade.

AGRADECIMENTOS

À *Deus*, pela vida e por me abençoar em todos os momentos.

À Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, na pessoa do magnífico Reitor *Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa* e à Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP), por meio do Diretor *Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior*.

À *Profª Drª Renata C. M. R. Garcia*, coordenadora dos cursos de pós graduação da FOP/UNICAMP e à *Profª Drª Cinthia P. M. Tabchoury*, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FOP/UNICAMP.

À minha co-orientadora, *Profª Drª Marta Cristina Teixeira Duarte*, pela atenção dispensada sempre que solicitada, pelos ensinamentos, dedicação, carinho e amizade.

À fundação de Amparo a Pesquisa no Estado de São Paulo, *FAPESP*, pela bolsa e auxílio de pesquisa concedidos.

Aos professores da Área de Farmacologia, Anestesiologia, e Terapêutica, *Profª Drª Maria Cristina Volpato*, *Prof. Dr. Eduardo Dias de Andrade*, *Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo* e *Prof. Dr. José Ranali*, pelo apoio, atenção, pelos ensinamentos e amizade.

Aos professores das bancas de qualificação primeira e segunda fase, *Profª Drª Vivian Fernandes Furletti*, *Prof. Dr. Cláudio Lima de Aguiar* e *Profª Drª Ana Lúcia Tasca Góis de Ruiz*, pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições que fizeram em meu trabalho.

Aos professores titulares e suplentes da banca de defesa desta dissertação, *Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen*, *Profª Drª Regiane Yatsuda*, *Profª Drª Carina denny*, *Prof. Dr. Gilson César Nobre Franco* e *Profª Drª Marili Villa Nova Rodrigue* pela

disponibilidade.

Aos colaboradores do meu projeto, *Prof. Dr. Adilson Sartoratto, Profª Drª Vera Rehder, Profª Drª Glyn Figueira, Profª Drª Ana Lúcia Ruiz, Prof. Dr. Severino de Alencar e Prof. Dr. Masaharu Ikegaki*, pela ajuda e disponibilidade.

Aos professores e funcionários *Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Maranhão*, por minha formação acadêmica, pelos ensinamentos e dedicação durante os cinco anos da minha graduação.

À *Profª Drª Cecília Ribeiro*, por acreditar em mim e me incentivar a realizar meus sonhos.

À *Eliane Melo*, pela amizade, pelos melhores conselhos e pelo cuidado durante todos esses anos, você fez tudo parecer mais fácil.

À *Elisa dos Santos*, que com sua bondade e carinho estava sempre disposta a me ajudar.

Ao *José Carlos* pelos momentos de descontração e pela boa música.

Ao meus amigos de mestrado da farmacologia *Ana Paula Bentes, Cristina Caldas, Fabiana Nolasco, Inês Juliana, Luciano Serpe, Marcelo Franchin, Salete Fernandes*, pela ótima convivência e amizade, e especialmente à *Camila Batista, Cleiton Pitta, Luiz Eduardo e Marcos Cunha*, que estiveram ao meu lado em todos os momentos, não me deixando fraquejar, sempre com um sorriso e uma palavra de conforto, vocês foram e são os melhores companheiros de jornada que eu poderia ter.

Aos outros amigos da farmacologia, *Carina* (minha mãe adotiva), *Bruno Bueno, Karina Cogo, Gilson César, Bruno Vilela, Luciana Berto, Fabiano Brito, Fabrício Favero, Luciana Berto, Mirian Cavalini, Myrella Castro, Vanessa e Talita Graziano* pelo apoio, incentivo e amizade.

À *Vivian, Vivi*, por ter estado ao meu lado durante todos esses anos, me ajudando não só no laboratório, mas sendo uma amiga presente, com a qual eu pude contar sempre que precisei. Muito obrigada por tudo!

À *Luciana Almeida*, Lóci, que além de um exemplo, sempre esteve disposta a me ensinar e se tornou uma grande amiga.

Às melhores companhias de casa que eu poderia ter, *Sonia, Cristina e Ariene*, pelo apoio, carinho, risadas e compreensão.

À *Leila Servat* e *Patrícia Zago*, por terem me abrigado diversas vezes em seus aconchegantes lares e, principalmente, pela amizade de vocês.

À todos os funcionários da FOP que de alguma forma trabalharam para eu conseguisse atingir meus objetivos e, principalmente, aos motoristas, *Carlão, seu Isaías* e *Alexandre*, pelas vezes que me levaram ao CPQBA, sempre dispostos, sorrindo e com uma palavra amiga, muito obrigada.

À todos os meus companheiros do CPQBA, *Renata Duarte, Camila Delarmina, Márcio de Oliveira, Mariana Binatti, Adriana, Cinésio, Prof^a Dr^a Mary Ann*, por toda ajuda, ensinamentos e amizade.

À minha família de São Paulo, *Tia Ariene, Fábio, Fernanda, André, Luiza, Giovanna, Karla, Geraldo, Mary, Rafael e Alexandre*, pelo amor, apoio e pelos melhores finais de semana que passei nesses dois anos.

Às minhas tias, *Rizza* e *Ghirza*, que são minhas mães, por toda preocupação e cuidado que tiveram comigo durante todo esse tempo, amo vocês.

À toda minha família, *pais, irmãs, tios, tias, primos, primas, tios-avós, Sheila*, por serem as pessoas mais especiais que já conheci, a base de tudo, meus grandes incentivadores.

À *Rayssa Soares*, minha terceira irmã, e à *Lara Rêgo*, por todo amor.

À *Kássia, Karla, Karenn, Marília, Tia Ildete* e *Seu José Carlos*, pelo carinho que têm por mim e por torcerem pela minha realização.

Aos meus amigos de infância, *Sâmia, Nádia, Tágora, Layssa, Mário Neto, Rodrigo Antonio, Rodrigo França, Bruno Campelo, Natália Coelho* e *Renata Brandrão* que mesmo de longe, estiveram sempre torcendo por mim e vibrando com as minhas conquistas.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos!

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.”

Charles Chaplin

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana, *in vitro*, de óleos essenciais e frações dos óleos de melhor atividade, contra microrganismos do grupo mutans em estado planctônico. Além disso, os biofilmes de *Streptococcus mutans* foram submetidos às frações ativas e os óleos de melhor atividade e frações ativas foram avaliados quanto à sua citotoxicidade e caracterizados quimicamente. Para isso, vinte óleos essenciais (OE) foram obtidos por hidrodestilação a partir de plantas pertencentes ao banco de germoplasmas da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA/CPQBA/UNICAMP). Estes OE foram avaliados quanto à sua atividade antimicrobiana por meio dos ensaios: concentrações inibitória (CIM) e bactericida mínima (CBM) contra *Streptococcus mutans* UA159. Controles positivo (clorexidina 0,12 %) e negativo (propilenoglicol 6,12 % e 25 %) também foram testados. Dos vinte OE testados, quatro foram selecionados de acordo com os seguintes critérios: atividade antimicrobiana ($CIM < 250 \mu\text{g.mL}^{-1}$), rendimento dos OE, disponibilidade comercial, plantas cujo OE estivesse disponível em partes aéreas e facilidade de cultivo. As análises químicas foram realizadas por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetria de massas (CG-EM). O fracionamento dos OE selecionados foi realizado e resultou na obtenção de 15 frações. Estas frações também foram submetidas aos ensaios antimicrobianos citados e selecionadas de acordo com os critérios de atividade antimicrobiana e rendimento. As frações ativas selecionadas (FAS) foram avaliadas quanto à sua ação em biofilme de *S. mutans*, o qual foi examinado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a atividade antiproliferativa dessas FAS, assim como de seus respectivos OE foi avaliada contra linhagem de célula normal (queratinócitos humanos) e também contra linhagens tumorais humanas. Os valores de CIM obtidos para os vinte OE testados variaram de 31,2 a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e os de CBM de 62,5 a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O fracionamento dos OE selecionados (*Aloysia gratissima*, *Baccharis dracunculifolia*, *Coriandrum sativum* and *Lippia sidoides*) resultou em 15 frações cujos valores de CIM e CBM variaram de 15,6 a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e de 31,2 a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente. De acordo com os critérios citados acima, quatro frações foram selecionadas (Ag₄, Bd₂, Cs₄ e Ls₃) como frações ativas e analisadas por CG-EM o que mostrou a presença de terpenos (mono e sesquiterpenos), aldeídos e alcoóis. As FAS inibiram a formação de biofilme de *S.*

mutans em todas as concentrações testadas ($p < 0,05$) e isto pôde ser observado por MEV. A queda de pH do biofilme em presença de glicose não foi inibida por nenhuma das FAS. As FAS não interferiram na proliferação celular de linhagens normais, entretanto mostraram-se seletivas contra as linhagens tumorais avaliadas neste estudo. Assim, dos 20 OE avaliados, quatro mostraram-se mais promissores e o fracionamento desses resultou, dentre outras frações, em quatro FAS com maior atividade antimicrobiana aliada à capacidade de inibição de formação de biofilme de *S. mutans*. Além disso, essas mesmas frações foram capazes de inibir o crescimento de células tumorais o que torna estas FAS promissoras para o descobrimento de novas moléculas bioativas.

palavras-chave: Óleos essenciais, *Streptococcus mutans*, Biofilme, atividade antiproliferativa.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* antimicrobial activity of essential oils (EO) and fractions from highest activity EO against planktonic cells of mutans streptococci. Besides, the biofilms formed by this microorganism were submitted to active fractions and the higher activity EO and active fractions were evaluated regarding their cytotoxicity and chemically characterized. For this, twenty essential oils were obtained from plants of the “Collection of Medicinal and Aromatic Plants” (CPMA, CPQBA/UNICAMP), germplasm bank by hydrodistillation. These EO were evaluated by antimicrobial assays: minimum inhibitory (MIC) and bactericidal (MBC) concentrations against *Streptococcus mutans* UA159. Positive (chlorhexidine 0.12%) and negative (propylene glycol 6.12 % and 25%) controls were also tested. From 20 EO tested, four were selected according to the following criteria: best antimicrobial activity (MIC < 250 µg.mL⁻¹), extract yield, commercial availability, EO extracted from aerial part of plant and easy cultivation. Thin Layer Chromatography (TLC) and Gas Chromatography/Mass spectrometry (GC-MS) were used for the phytochemical analysis. EO fractionation was done by dry column, resulting in 15 fractions. These fractions were also submitted to antimicrobial assays and selected based in antimicrobial and yields criteria. The action of these selected active fractions (SAF) on *S. mutans* biofilm was evaluated and examined by Scanning Electron Microscopy (SEM) and their antiproliferative activity determined by antiproliferative assay against normal cell line (keratinocytes) and also against human cancer cell lines. MIC values obtained for all EO ranged from 31.2 to 500 µg.mL⁻¹, and the MBC from 62.5 to 1000 µg.mL⁻¹. The fractionation of selected EO (*Aloysia gratissima*, *Baccharis dracunculifolia*, *Coriandrum sativum* and *Lippia sodoides*) resulted in 15 fractions. MIC and MBC fraction values ranged from 15.6 to 500 µg.mL⁻¹ and 31.2 to 1000 µg.mL⁻¹, respectively. According to the criteria adopted, four fractions were selected as active fractions (Ag₄, Bd₂, Cs₄ and Ls₃) and their analysis by GC-MS showed the presence of terpenes (mono and sesquiterpenes), aldehydes and alcohols. These SAF fractions inhibited the *S. mutans* biofilm formation at all concentrations tested (p < 0.05) and these were shown by SEM. Glycolytic pH drod was not inhibited by any SAF fraction. The SAF did not interfere on normal cell line proliferation, however showed active against tumor cell lines evaluated in this study. Thus, among 20 EO evaluated,

four showed promising properties and were fractioned. The fractionation process resulted in four active fractions with high antimicrobial activity and capacity to inhibit *S. mutans* biofilm formation. Moreover, these active fractions were able to inhibit growth of tumor cell lines which enables to classify them as a promise for discovery of new bioactive molecules.

Key-words: Essential oils, *Streptococcus mutans*, Biofilm, antiproliferative activity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS¹

Ag - Óleo essencial de *Aloysia gratissima* (*A. gratissima* essential oil). Cada fração deste mesmo óleo possui uma numeração na posição subescrita.

Bd - Óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* (*B. dracunculifolia* essential oil). Cada fração deste mesmo óleo possui uma numeração na posição subescrita.

CBM (MBC) - Concentração bactericida mínima (Minimal bactericidal concentration).

CCD (TLC) - Cromatografia em camada delgada (Thin layer chromatography).

CIM (MIC) - Concentração inibitória mínima (Minimal Inhibitory concentration).

CG-EM (GC-MS) - Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetria de massa (Gas chromatography coupled to mass spectrometry).

CPMA – Coleção de plantas medicinais e aromáticas.

CPQBA – Centro pluridisciplinar de pesquisas químicas, biológicas e agrícolas.

Cs - Óleo essencial de *Coriandrum sativum* (*C. sativum* essential oil). Cada fração deste mesmo óleo possui uma numeração na posição subescrita.

DMSO - Dimethyl sulfoxide

FAS (SAF) - Frações ativas selecionadas (Selected active fractions)

Ls - Óleo essencial de *Lippia sidoides* (*L. sidoides* essential oil). Cada fração deste mesmo óleo possui uma numeração na posição subescrita.

MEV (SEM) - Microscopia eletrônica de varredura (Scanning Electron Microscopy)

OE - Óleos essenciais

¹ Abreviaturas entre parêntesis correspondem à versão na língua inglesa.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1: <i>Antimicrobial activity of Essential Oils on Streptococcus mutans and antiproliferative effects</i>	5
CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33
APÊNDICE: Tabela com dados utilizados para cálculo do rendimento dos óleos essenciais.	36
Anexo 1: Informação CCPG/002/06 Trata do Formato Padrão das Dissertações de Mestrado e Teses de Doutorado da UNICAMP	37
Anexo 2: Certificado de aprovação do Comitê de Ética Ambiental – Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP	39
Anexo 3: Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - Faculdade e Odontologia de Piracicaba/UNICAMP	41
Anexo 4: Comprovante de submissão do artigo científico à revista proposta	42
Anexo 5: Certificado de correção e revisão do artigo científico na língua inglesa.	43
Anexo 6: Carta de aceite do artigo científico	44

INTRODUÇÃO

A cárie dental representa um grande problema de saúde coletiva bucal (Dinelli *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2006), tanto no Brasil (Brasil, 1988, 1996; Dantas *et al.*, 2000) como na maior parte do mundo (Weyne, 1997; Martins *et al.*, 1999; Loretto *et al.*, 2000) e esses achados são confirmados pelos resultados do último Saúde Bucal (SB) Brasil (Brasil, 2010).

Dessa forma, a doença cárie continua sendo, dentro da odontologia, a doença de maior prevalência (Maia *et al.*, 2007), mesmo sabendo que nas últimas décadas houve um avanço em relação à etiologia e à prevenção da mesma com especial destaque ao uso de fluoreto nas mais variadas formulações (Alves *et al.*, 2010).

A cárie é uma doença infecciosa multifatorial causada pelo acúmulo de biofilme na superfície do dente (Marsh, 2003) e pelo consumo frequente de carboidratos fermentáveis (Bowen *et al.*, 1980). Quando ocorrem alterações no pH da matriz do biofilme, causados pela dieta, microrganismos ou fluxo e\ou componentes salivares há um desequilíbrio entre o biofilme e o hospedeiro o que leva ao aparecimento de doenças como a cárie, cujo principal agente etiológico é o *Streptococos* do grupo mutans (*S. mutans*).

Pela teoria da “placa específica”, certos tipos de placas bacterianas (ou biofilmes bacterianos) são consideradas odontopatogênicas, pois são colonizadas por cepas bacterianas capazes de determinar uma quantidade mensurável de cárie dentária. Estas espécies odontopatogênicas incluem *S. mutans* e *Lactobacillus* que são responsáveis por boa parte das lesões de cárie, embora seja possível a ocorrência de placa sem que haja doença, significando a presença de placa não dominada pelos organismos odontopatógenos (Marinho & Pereira, 1998).

A constante presença desses microrganismos, odontopatógenos, aderidos à superfície dental, pode causar a desmineralização dessa superfície pela fermentação de carboidratos ingeridos na dieta. Estes microrganismos são considerados cariogênicos por produzirem ácidos orgânicos fracos a partir da sacarose (acidogênicos) e manterem o seu metabolismo mesmo em pHs baixos (acidúricos) (Lemos *et al.*, 2005). Além disso, essas bactérias produzem polissacarídeos intra e extracelulares de reserva e extracelulares insolúveis, que são responsáveis pela

adesividade da placa bacteriana (Yoshizumi *et al.*, 2007; Loesche, 1986; Macpherson *et al.*, 1992).

Sabendo que os produtos naturais têm contribuído significativamente na descoberta de estruturas químicas para o desenvolvimento de novos fármacos, que serão usadas como agentes inovadores na terapêutica de doenças muito prevalentes, como é o caso da cárie (Clardy & Wash, 2004), têm-se buscado cada vez mais recursos alternativos para o tratamento e controle da mesma, principalmente utilizando substâncias que tenham ação contra a bactéria em estado de biofilme, cuja configuração representa um estado de preservação da comunidade bacteriana organizada dessa forma, tornando-se mais difícil de ser desorganizada ou sensibilizada por agentes antimicrobianos (Furletti *et al.*, 2011).

Por isso a importância de pesquisas sobre fontes naturais de fármacos no Brasil, onde estão localizadas cerca de 20 % das 250 mil espécies de plantas medicinais catalogadas pela UNESCO (Drumond *et al.*, 2004, Funari & Ferro 2005), e esta biodiversidade brasileira favorece o aproveitamento do potencial de cura desses vegetais para o tratamento de doenças, inclusive na odontologia.

Apesar disso, sabe-se que apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e apenas 1.110 delas foram avaliadas quanto suas propriedades medicinais (Garcia *et al.*, 1996). Por outro lado, crescimento do mercado de medicamentos fitoterápicos é da ordem de 15 % ao ano, enquanto que o de medicamentos sintéticos é de 3 a 4 % (Simões *et al.*, 2003) e cerca de 50 % das novas drogas aprovadas por órgãos regulamentadores no mundo procedem direta ou indiretamente de produtos naturais, (Butler, 2005; Newman & Cragg, 2007), por isso esse mercado de produtos farmacêuticos derivados de plantas é muito promissor, além de se constituir em uma opção terapêutica eficaz e apropriada.

Entre os produtos de origem natural, as plantas aromáticas têm sido empregadas na medicina popular há muitos séculos (Inamul, 2004; Lakmichi *et al.* 2011) e destas plantas pode-se extrair óleos essenciais (OE), utilizados para proteção da planta e atração de polinizadores (Simões *et al.*, 2003), sendo usados como agentes antimicrobianos contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (Queiroga *et al.*, 2006).

Esses OE estão presentes em quase duas mil espécies de plantas distribuídas em sessenta famílias (Maffei *et al.*, 2011), relacionados com algumas funções necessárias à sobrevivência vegetal e 35 % dos óleos estudados exibem propriedades antimicrobianas (Maffei *et al.*, 2011). No entanto, existem poucas pesquisas sobre a atividade inibitória de OE em bactérias causadoras da cárie (Koo *et al.*, 2000), além disso, estes estudos em geral não possibilitam a reprodutibilidade, tendo em vista a diversidade do material natural e sua não caracterização biológica, química e botânica.

Os OE são também conhecidos por óleos voláteis e são extraídos das plantas, sobretudo por hidrodestilação, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, que geralmente possuem certo odor e são líquidas. Possuem aparência oleosa à temperatura ambiente, são solúveis a solventes orgânicos apolares, com solubilidade limitada em água, porém suficiente para aromatizar soluções aquosas.

Outra característica física dos OE é que têm sabor geralmente acre e picante, são incolores ou amarelados logo quando extraídos, não são muito estáveis na presença do ar, calor, luz, umidade e metais, a maioria possui índice de refração e são opticamente ativos (Sousa, 2012).

Os OE, que são produtos do metabolismo secundário das plantas, apresentam toxicidade sobre alguns microrganismos, isso ocorre por causa da alta complexidade de sua fórmula química e da presença de grupamentos alcoóis, fenóis, ésteres, ácidos, aldeídos e terpenos que podem explicar sua ação bacteriostática e bactericida (Sousa, 2012).

São, em sua grande maioria, derivados de terpenóides ou fenilpropanóides. Os terpenoides preponderam, são derivados de unidades do isopreno e os mais frequentes são os monoterpenos (90 % dos óleos) e os sesquiterpenos. E os fenilpropanóides se formam a partir do ácido chiquímico, que compõe as unidades básicas dos ácidos cinâmico e p-cumárico (Simões *et al.*, 2003; Lupe, 2007; Sousa, 2012).

Dessa forma, cresce o interesse por produtos naturais que apresentem atividade antibacteriana seletiva de forma a evitar e tratar doenças bucais biofilme dependentes, com o mínimo de efeitos adversos e o máximo de efetividade para os seus usuários. Para que isso ocorra, deve-se avaliar a efetividade desses produtos

naturais, identificando-os, isolando-os e sintetizando os compostos biologicamente ativos, fazendo estudos laboratoriais *in vitro*, passando por estudos *in vivo* e por fim com estudos clínicos longitudinais (Ten Cate & Marsh, 1994). Por isso é importante que sejam feitos estudos aprofundados acerca de OE, assim como de outras fontes de medicamentos naturais, para tentar controlar problemas como a cárie dental, uma doença infecciosa biofilme dependente.

Mesmo conhecendo a diversidade vegetal, poucas espécies têm sido avaliadas quanto à sua qualidade, segurança e eficácia (Simões *et al.*, 2001; Soares *et al.*, 2006; Sousa, 2012). Dessa forma, além de avaliar a atividade antimicrobiana, é importante saber se esses produtos naturais com efetiva atividade farmacológica não provocam danos às linhagens celulares humanas normais e também se possuem alguma toxicidade específica contra linhagens celulares tumorais, que é uma característica desejada, pois uma vez que os OE ou outros produtos naturais são fracionados, pode-se concentrar compostos com toxicidade seletiva nestas frações ativas (Carvalho, 2006).

Além disso, a literatura científica vem mostrando que drogas com atividade antimicrobiana e/ou anti-inflamatória possuem ação antitumoral, como é o caso de peptídeos antimicrobianos (Suttman *et al.*, 2008, Roskin e Ramamoorthy, 2008). Da mesma forma, drogas com atividade antitumoral, como é o caso da doxorubicina, também têm se mostrado ativas contra algumas bactérias (Peiris and Oppenheim, 1993).

Neste contexto, o presente trabalho estudou 20 plantas medicinais do “Banco de Germoplasmas” da “Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas” do CPQBA/UNICAMP, com o intuito de extrair delas o seu OE e testá-los contra *S. mutans* UA159, principal causadora da cárie dental (Løe, 1978; Loesche, 1986). Além disso, os óleos essenciais que apresentaram melhores resultados, foram fracionados quimicamente por coluna seca para que fossem identificadas as frações ativas responsáveis pelo efeito biológico. Estas frações ativas foram avaliadas em biofilme de *S. mutans* e juntamente com os óleos de melhor atividade foram quimicamente caracterizadas e avaliadas quanto à sua citotoxicidade em células humanas normais (queratinócitos) e contra linhagens celulares tumorais.

CAPÍTULO 1

Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Streptococcus mutans* and their Antiproliferative Effects

Lívia Câmara de Carvalho Galvão¹, Vivian Fernandes Furletti², Salete Meyre Fernandes Bersan¹, Marcos Guilherme da Cunha¹, Ana Lúcia Tasca Góis de Ruiz², Adilson Sartoratto², Vera Lúcia Garcia Rehder², Glyn Mara Figueira², Marta Cristina Teixeira Duarte², Masarahu Ikegaki³, Severino Matias de Alencar⁴, Pedro Luiz Rosalen^{1*}

¹*Department of Pharmacology, Anesthesiology and Therapeutics, Piracicaba Dental School, University of Campinas (UNICAMP), 13414-903, Piracicaba, SP, Brazil*

²*Research Center for Chemistry, Biology and Agriculture, University of Campinas (UNICAMP), CP 6171, 13083-970, Campinas, SP, Brazil*

³*School of Pharmacy and Dentistry, Federal University of Alfenas, 37130-000, Alfenas, MG, Brazil*

⁴*Department of Agri-food Industry, Food and Nutrition, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), University of São Paulo, CP 9, 13418-900, Piracicaba, SP, Brazil*

Correspondence should be addressed to Pedro Luiz Rosalen, rosalen@fop.unicamp.br

Tel.: +55 19 2106-5313; fax: +55 19 2106-5308

This study aimed to evaluate the activity of essential oils (EO) against *Streptococcus mutans* biofilm by chemically characterizing their fractions responsible for biological and antiproliferative activity. Twenty EO were obtained by hydrodistillation and submitted to the antimicrobial assay [minimum inhibitory (MIC) and bactericidal (MBC) concentrations] against *S. mutans* UA159. Thin layer chromatography and gas chromatography/mass spectrometry were used for phytochemical analyses. EO were selected according to pre-determined criteria and fractionated using dry column; the resulting fractions were assessed by MIC and MBC, selected as active fractions, and evaluated against *S. mutans* biofilm. Biofilms formed were examined using scanning electron microscopy. Selected EO and their selected active fractions were evaluated for their antiproliferative activity against keratinocytes and seven human tumor cell lines. MIC and MBC values obtained for EO and their active fractions showed strong antimicrobial activity. Chemical analyses mainly showed the presence of terpenes. The selected active fractions inhibited *S. mutans* biofilm formation ($p < 0.05$), did not affect glycolytic pH drop and were inactive against keratinocytes, normal cell line. In conclusion, EO showed activity at low concentrations and their selected active fractions were also effective against biofilm formed by *S. mutans* and human tumor cell lines.

1. Introduction

Despite the implementation of measures to control and treat dental caries with fluoride, they remain the most prevalent dental disease in many countries [1]. Caries are a multifactorial infectious disease caused by accumulation of biofilm on tooth surface [2]. Manifestations of the disease occur when there is an imbalance between the biofilm and the host due to changes in biofilm matrix pH caused by diet, microorganisms, or salivary flow and their components [3, 4].

Streptococcus mutans is considered the most cariogenic of all oral streptococci [5]. *S. mutans* is able to colonize the tooth surface and to produce large amounts of extra and intra-cellular polysaccharides. This microorganism is also highly acidogenic and aciduric, and it

metabolizes several salivary glycoproteins, thus being responsible for the initial stage of oral biofilm formation and caries lesions [6].

Several products have been used to control dental caries, such as fluoride, chlorhexidine, and their associations [7]. However, natural products have contributed significantly to the discovery of chemical structures to create new medicaments to be used as innovative therapeutic agents against this prevalent disease [8, 9].

Essential oils (EO) are important for their detected antimicrobial activity [10–12] including that against *S. mutans* [13]. They are, complex, volatile, natural compounds formed by aromatic plants as secondary metabolites [14]. They are known for their bactericidal, virucidal, fungicidal, sedative, anti-inflammatory, analgesic, spasmolytic and locally anesthetic properties [14]. The presence of complex chemical structures constituted of several groups, such as terpenes and terpenoids, aromatic and aliphatic constituents, all characterized by low molecular weight, may explain their successful bacteriostatic and bactericidal action [14].

Additionally, it was attested that the antimicrobial activity of a natural product, such as EO, is important to evaluate its effects on human normal cell lines and also against human tumor cell lines in order to evidence potential toxicity on human healthy and tumor cell lines [15]. For this reason, it is important that extensive studies involving EO as well as other sources of natural medicines are carried out.

The aim of this study was to evaluate the activity of EO and fractions against planktonic cells of *S. mutans* and also the selected active fractions of EO were chemically characterized and evaluated against *mutans* biofilm and antiproliferative activity on human cells.

2. Materials and methods

2.1. Medicinal Plants. We studied 20 medicinal and aromatic plants (Table 1), which were obtained from the germoplasm bank of the Collection of Medicinal and Aromatic Plants

(CPMA) of the Research Center for Chemistry, Biology and Agriculture (CPQBA), University of Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brazil (www.cpqba.unicamp.br), and identified by Glyn M. Figueira, curator of CPMA.

The plants were collected from November 2009 to January 2011, during the morning, after the dew point has been reached. The vouchers of each species were deposited in the herbarium of the Institute of Biology, at UNICAMP – UEC, and also registered in the herbarium of CPQBA, receiving identification numbers (CPMA number).

2.2. Essential Oil Extraction. EO were obtained from 100 g of aerial fresh plant parts by hydrodistillation using a Clevenger-type system, for 3 hours. The aqueous phase was extracted with 50 mL of dichloromethane. Then, the organic layer was separated, dried over anhydrous sodium sulphate (Na_2SO_4), filtered, and the solvent was removed by vacuum evaporation at room temperature, resulting in EO. Oil samples were stored at -25°C in sealed glass vials [11].

2.3. Fractionation of Essential Oils. In order to select the EO that should be fractionated, we pre-determined some criteria: best antimicrobial activity ($\text{MIC} < 250 \mu\text{g/mL}$), extract yield ($> 0.5\%$, except for *Coriandrum sativum* EO), commercial availability, presence of the EO in aerial parts of plants, and easy cultivation. The resulting fractions were also submitted to the antimicrobial assay.

Fractionation was performed using dry column chromatography (cellulose $2 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$) with Si gel 60 (Merck, Darmstadt, Germany) as the stationary phase and dichloromethane as the mobile phase, previously chosen by thin layer chromatography (TLC), visualized under UV 254 nm, followed by anisaldehyde solution application and drying at 105°C for 5 min. After elution, columns were cut into different parts for each EO, according to polarity and extraction, using dichloromethane. The fractions so obtained were analyzed using TLC and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and then bioguided using the

antimicrobial assays [16]. All chemical wastes generated during this study were treated according to the Environmental Ethics Committee of UNICAMP (324/2009).

2.4. Analyses of the Selected Active Fractions using GC-MS. The chemical composition of each selected active fraction was evaluated using a Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph equipped with an HP-5975 mass selective detector and HP-5 capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm). GC-MS was performed using split injection with the injector set at 220°C, the column set at 60°C with a heating ramp of 3°C/min and a final temperature of 240°C, and the MS detector set at 250°C. Helium was used as a carrier gas at 1 mL/min. The GC-MS electron ionization system was set at 70 eV. The quantitative analyses were performed using a Hewlett-Packard 5890 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector under the same conditions previously described. A sample of each EO or its selected active fraction was solubilized in ethyl acetate (15 mg/mL) for the analysis. Retention indices (RI) were determined using injection of hydrocarbon standards and EO samples under the same conditions described above. The oil components were identified by comparison with data described in the literature and the profiles in the NIST 05 mass spectral library [11, 17].

2.5. Microorganisms. For the development of this study, *Streptococcus mutans* UA159 was used.

2.6. Antimicrobial Assay. We tested 20 EO using the antimicrobial assay and selected them according to pre-determined criteria (item 2.3) before being fractionated and continuing the bioguided study.

MIC test was carried out using tissue culture microplates (96 wells) containing 100 µL/well BHI (Brain Heart Infusion, Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) medium [18]. The stock solutions of EO and fractions from selected EO (item 2.3) were diluted with propylene glycol (4 mg/mL), transferred to the first well, and serial dilutions were performed to obtain concentrations ranging from 7.81 to 1000 µg/mL. We used 0.12% chlorhexidine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as positive control and propylene glycol 6.25% as negative

control. The bacterial inoculum (1×10^6 UFC/mL) was added to all wells and the plates were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 24 hours. MIC was defined as the lowest concentration of EO or fraction from selected EO that inhibited microorganism visible growth indicated by resazurin 0.01% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) [19].

To determine MBC, an aliquot of each incubated well with concentrations higher than MIC was sub-cultured on BHI medium supplemented with 5% defibrinated sheep blood using a Whitley Automatic Spiral Plater (Don Whitley Scientific Limited, Shipley, West Yorkshire, UK). MBC was defined as the lowest concentration of EO or fraction that allowed no visible growth on the test medium.

To determine the nature of antibacterial effect of EO and fractions, the MBC:MIC ratio for bacteria was used [20]. When MBC:MIC ratio for *S. mutans* was between 1:1 to 2:1, the EO or fraction from selected EO was considered bactericidal against this microorganism [20], and when the ratio was higher than 2:1, it was considered bacteriostatic.

2.7. Action of Selected Active Fractions from Selected EO against S. mutans Biofilm. We tested 20 EO and those that fulfilled the pre-determined criteria (item 2.3) were selected to be chemically fractionated. The resulting fractions were also tested using the antimicrobial assay and selected according to MIC and MBC results and yields. The selected active fractions were then assessed regarding their action against *S. mutans* biofilm.

2.7.1. Inhibition of S. mutans Biofilm Growth. In order to evaluate the antimicrobial activity of EO selected active fractions against the formation of *S. mutans* biofilm, the samples were placed, at different concentrations (7.81–1000 µg/mL), in the wells of sterile polystyrene U-bottom microtiter plates, previously treated with saliva¹ [21]. *S. mutans* cells (1.0×10^7 cells/mL in BHI medium) were added to wells containing BHI medium with 2% sucrose and the samples were incubated at 37°C for 18 hours. Biofilm growth was revealed and quantified using the crystal violet staining method and measuring absorbance at 575 nm [11, 22].

¹ The use of human saliva in this study was approved by the Research Ethics Committee of the Piracicaba Dental School, State University of Campinas (UNICAMP) (Approval 087/2011).

After 18 hours of incubation, the spent medium was aspirated, non-adhered cells were removed, the wells were washed three times with sterile distilled water, and the plates were dried for 45 min before carrying out biofilm quantification [22].

2.7.2 Glycolytic pH-drop Assay. The effect of EO selected active fractions against *S. mutans* biofilm was measured using the standard glycolytic pH-drop assay [23]. Biofilm growth was carried out as previously described (item 2.7.1), in sterile polystyrene U-bottom microtiter plates without fractions. The biofilms so obtained were washed twice with 0.9% NaCl solution and salt solution (50 mM KCl + 1.0 mM MgCl₂), containing EO selected active fractions at different concentrations (1000, 500, and 250 µg/mL) and vehicle (25% propylene glycol, v/v), was added. The pH was adjusted to 7.2 with 0.1 M KOH solution, and glucose was added to a final concentration of 1%, and pH-drop was assessed using Orion® pH glass electrode attached to Orion® 290 A⁺ pHmeter (Orion Scientific, Houston, TX, USA) for 90 min.

2.8. Scanning Electron Microscopy (SEM). In order to evaluate *S. mutans* integrity using SEM, biofilms were first developed in Lab-Tek chambered coverglass (Nunc, Naperville, IL, USA), as described previously (item 2.7.1), were treated with vehicle (6.12% propylene glycol) or had their active fractions selected at concentrations able to inhibit more than 90% of *S. mutans* biofilm formation. Samples were fixed in 4% glutaraldehyde (v/v) in phosphate-buffered saline (PBS) at room temperature for 12–24 hours. After this procedure, the biofilms were dehydrated through a graded series of ethanol (50% to 100%), dried to a critical point, coated with gold, and observed using a scanning electron microscope JEOL JSM5600LV (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) [11, 24].

2.9. Antiproliferative Assay. The *in vitro* antiproliferative assay [25] was performed in the present study using a human keratinocyte (HaCat) cell line, kindly donated by Dr. Ricardo Della Coletta (FOP, UNICAMP, Brazil), and seven human tumor cell lines [U251 (glioma), MCF-7 (breast), NCI-ADR/RES (ovarian expressing phenotype multiple drugs resistance),

786-0 (renal), NCI-H460 (lung, non-small cells), PC-3 (prostate), and OVCAR-03 (ovarian)], kindly provided by M.A. Frederick (National Cancer Institute, USA). Stock and experimental cultures were grown in medium containing 5 mL RPMI-1640 (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 5% fetal bovine serum (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA). A penicilline-streptomycin mixture (1000 U/mL:1000 mg/mL, 1mL/L RPMI) was added to experimental cultures. Cells in 96-well plates (100 μ L cells/well) were exposed to each EO and selected active fractions in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0.25, 2.5, 25, and 250 μ g/mL) at 37°C and 5% CO₂ for 48 hours. Final DMSO concentration did not affect cell viability. Before (T₀ plate) and after sample addition (T₁ plates), cells were fixed with 50% trichloroacetic acid and cell proliferation was determined by spectrophotometric quantification (540 nm) of cellular protein content using sulforhodamine B assay. Using the concentration-response curve for each cell line, the total growth inhibition (TGI) was determined by non-linear regression analysis using the software Origin 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) [26, 27].

2.10. Statistical Analysis. An exploratory data analysis was performed to determine the most appropriate statistical test. Inhibition of biofilm growth and glycolytic pH-drop data were compared using the non-parametric Kruskal-Wallis test. P value < 0.05 was considered statistically significant. Triplicates from at least three separated experiments were conducted in each assay.

3. Results

3.1. Essential Oils and Fraction Yields. The EO yields, expressed in relation to dry weight of plant material (% w/w), are shown in Table 1.

TABLE 1: Medicinal and aromatic plants from the germplasm bank of the CPMA/CPQBA/UNICAMP selected for this study with their yield, MIC and MBC values, and MBC:MIC ratio.

Medicinal species	Family	Popular name	Source	CPMA no.	Voucher no. ¹	Yield (%)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MBC:MIC ratio ²	Popular use
<i>Aloysia gratissima</i> (Gillies & Hook)	Verbenaceae	Brazilian lavender	Leaf	714	UEC 121.393	1.1	125–250	250–500	2:1	Digestive, anti-spasmodic
<i>Aloysia triphylla</i> (L'Hér.) Britton	Verbenaceae	Alcisia	Leaf	274/700	UEC 121.412	0.3	125–250	125–250	1:1	Sedative, anti-spasmodic
<i>Alpinia speciosa</i> (Pers.) Burtt & Smith	Zingiberaceae	Colony	Root	447	UEC 145.185	0.2	125–250	250–500	2:1	Antimicrobial
<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC	Asteraceae	Broom weed	Leaf	1841	–	0.8	62.5–125	250–500	4:1	Tonic, eupeptic, antipyretic
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	Lauraceae	Cinnamon	Leaf	455	IAC 19824	0.2	250–500	500–1000	2:1	Carminative, anti-spasmodic
<i>Coriandrum sativum</i> L.	Apiaceae	Coriander	Leaf	664	–	0.3	31.2–62.5	62.5–125	2:1	Antimicrobial, antifungal
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf.	Poaceae	Lemon grass	Leaf	503	UEC 85.210	1.1	125–250	250–500	2:1	Sedative, analgesic, anti-cough
<i>Cymbopogon martinii</i> (Roxb.) J.F. Watson	Poaceae	Palmarosa	Leaf	354	UEC 127.115	0.6	125–250	250–500	2:1	Antiseptic, antifungal
<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt	Poaceae	Lemon verbena	Leaf	712	UEC 121.414	1.5	125–250	250–500	2:1	Repellent, insecticide
<i>Cyperus articulatus</i> Vahl	Cyperaceae	Piprioca	Bulbs	222	UEC 121.396	0.5	125–250	250–500	2:1	Anti-inflammatory
<i>Elyonurus muticus</i> Spreng	Poaceae	Agripalma	Leaf	1701	UEC 20.580	0.6	125–250	125–250	1:1	Antibacterial
<i>Eugenia florida</i> DC.	Myrtaceae	Guamirim-cereja	Leaf	1685	IAC 49207	0.3	125–250	500–1000	4:1	Anti-inflammatory
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Myrtaceae	Pitanga	Leaf	1816	–	0.7	125–250	250–500	2:1	Anti-hypertensive, diuretic
<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Brown	Verbenaceae	False lemon balm	Leaf	467/509	UEC 121.413	0.3	125–250	250–500	2:1	Treatment of migraines
<i>Lippia sidoides</i> Cham.	Verbenaceae	Rosemary	Leaf	398/399	–	4.7	62.5–125	125–250	2:1	Bactericide, fungicide
<i>Mentha piperita</i> L.	Lamiaceae	Mint	Leaf	560	UEC 127.110	2.2	250–500	250–500	1:1	Antifungal, antibacterial
<i>Mikania glomerata</i> Spreng.	Asteraceae	Guaco	Leaf	766	UEC 102.047	0.4	62.5–125	125–250	2:1	Anti-inflammatory, bronchodilator
<i>Siparuna gulanenses</i> Aubl.	Monimiaceae	Wild lemon	Leaf	2025	–	0.3	62.5–125	125–250	2:1	Tranquilizer, diuretic
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L. M. Perry	Myrtaceae	Cloves	Leaf	455	IAC 19624	0.5	62.5–125	250–500	4:1	Seasoning, antibacterial
<i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.	Rhamnaceae	Joazeiro fruit	Leaf	2119	–	0.5	250–500	500–1000	2:1	Astringent, anti-inflammatory

¹ A voucher herbarium specimen is a pressed plant sample deposited for future reference. Vouchers deposited at UEC herbarium (www.ib.unicamp.br/herbario/) at Biology Institute (IB) of UNICAMP, SP, Brazil. (–) Species with no voucher number registered.

² The EO were considered bactericidal when the MBC:MIC ratio was between 1:1 to 2:1 and bacteriostatic if this ratio was higher than 2:1.

According to pre-determined criteria (item 2.3), four EO were selected to be fractionated using dry column, as follows: *A. gratissima*, *B. dracunculifolia*, *C. sativum*, and *L. sidoides*.

The yields of the fractions from selected EO were expressed as a function of the respective EO yield (% w/w) and are shown in Table 2. The yields of *A. gratissima* fractions ranged from 14.4% to 29%, *B. dracunculifolia* from 20.1% to 30.6%, *C. sativum* from 4.9% to 30.9%, and *L. sidoides* from 1.7% to 33.3%.

3.2. Antimicrobial Activity. MIC and MBC values for all tested EO are shown in Table 1. MIC values ranged from 31.2 to 500 µg/mL and MBC values ranged from 62.5 to 1000 µg/mL. The highest activities were observed for *A. gratissima* and *A. triphylla* (125–250 µg/mL), *B. dracunculifolia*, *L. sidoides*, *M. glomerata*, *S. guianenses*, and *S. aromaticum* (62.5–125 µg/mL), and *C. sativum* (31.2–62.5 µg/mL).

Based on pre-determined criteria (item 2.3), four EO (*A. gratissima*, *B. dracunculifolia*, *C. sativum*, and *L. sidoides*) were selected to be fractionated. MIC and MBC values of fractions from selected EO are shown in Table 2. MIC values obtained for all fractions ranged from 15.6 to 500 µg/mL, and MBC values ranged from 31.2 to 1000 µg/mL. The highest activities were observed for the fractions Ag₄ (31.2–62.5 µg/mL), Bd₂ (15.6–31.2 µg/mL), Cs₄ (15.6–31.2 µg/mL), and Ls₃ (62.5–125 µg/mL).

The MBC:MIC ratio (Table 1) showed that most EO are bactericidal, except for *B. dracunculifolia*, *E. florida*, and *S. aromaticum*, considered bacteriostatic against *S. mutans*. Among the selected EO chosen to be fractionated, only that obtained from *B. dracunculifolia* was bacteriostatic. Most fractions from selected EO were bactericidal, except for Ag₄, Cs₁, Ls₂, and Bd₂, considered bacteriostatic against *S. mutans* (Table 2). Based on yield and antimicrobial activity, Ag₄, Bd₂, Cs₄, and Ls₃ fractions were selected for further evaluations.

TABLE 2: Selected EO and their fractions with yield results, MIC and MBC values, and MBC:MIC ratio.

Essential oil			Fraction				
Identification	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	Identification	Yield (%)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC:MIC ratio ¹
<i>Aloysia gratissima</i> (Ag)	125–250	250–500	Ag ₁	28.9	250–500	500–1000	2:1
			Ag ₂	17.9	250–500	500–1000	2:1
			Ag ₃	20.1	62.5–125	500–1000	8:1
			Ag₄ ²	14.4	31.2–62.5	62.5–125	2:1
<i>Baccharis dracunculifolia</i> (Bd)	62.5–125	250–500	Bd ₁	30.5	250–500	500–1000	2:1
			Bd ₂	22.1	15.6–31.2	125–250	8:1
			Cs ₁	6.6	125–250	500–1000	4:1
			Cs ₂	4.9	125–250	250–500	2:1
<i>Coriandrum sativum</i> (Cs)	31.2–62.5	62.5–125	Cs ₃	12.7	15.6–31.2	31.2–62.5	2:1
			Cs ₄	30.9	15.6–31.2	31.2–62.5	1:1
			Ls ₁	13.6	250–500	500–1000	2:1
			Ls ₂	33.3	62.5–125	250–500	4:1
<i>Lippia sidoides</i> (Ls)	62.5–125	125–250	Ls ₃	26	62.5–125	125–250	2:1
			Ls ₄	6.1	62.5–125	125–250	2:1
			Ls ₅	1.7	62.5–125	125–250	2:1

¹ The fractions from selected EO were considered bactericidal when the MBC:MIC ratio was between 1:1 to 2:1, and bacteriostatic if this ratio was higher than 2:1.

² The fractions in bold type were selected as active fractions and evaluated against *S. mutans* biofilm and for their antiproliferative action. The subscript numbers of the fractions represent the numbers of parts obtained using the dry column fractionation.

3.3. Selected Active Fractions Activity against *S. mutans* Biofilm. Figure 1 shows the development of *S. mutans* biofilm inhibition after treatment with selected active fractions. Their growth was measured by optic density at 575 nm. The result showed that the selected active fractions tested at different concentrations were significantly different ($P < 0.05$) from the vehicle. Moreover, Cs₄ and Bd₂ fractions presented a better performance since they inhibited more than 90% of biofilm formation at lower concentrations (31.2 µg/mL).

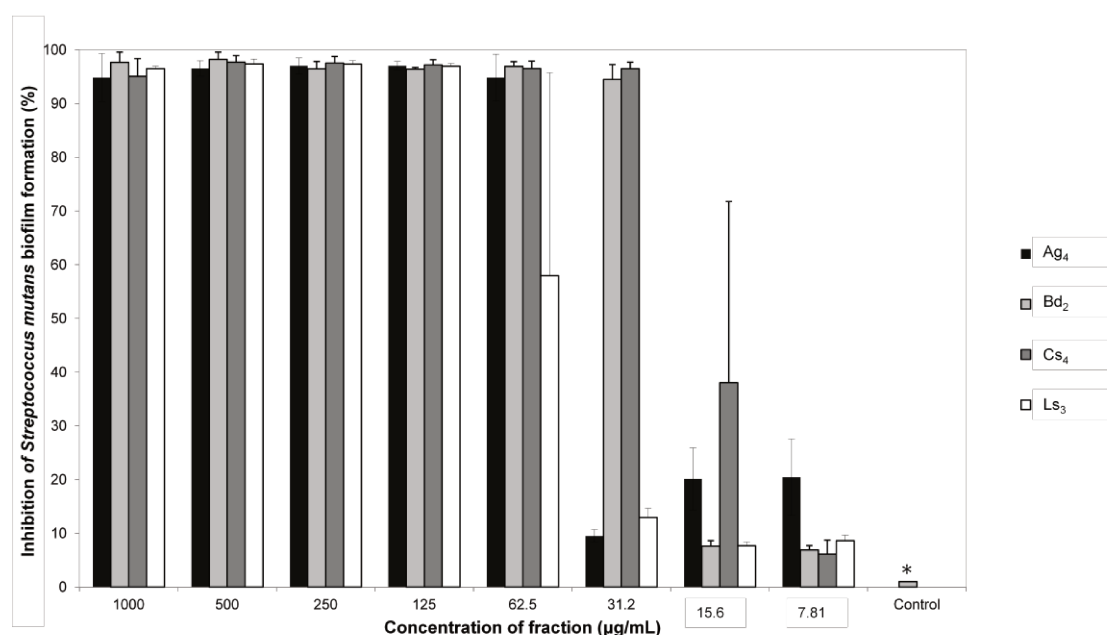


FIGURE 1: Influence of selected active fractions Ag₄, Bd₂, Cs₄, and Ls₃ from selected essential oils at different concentrations against *Streptococcus mutans* biofilm formation. All fractions tested were significantly different from the vehicle at all concentrations tested. Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$).

3.4. pH-Drop Assay. The influence of selected active fractions from EO on glycolytic pH-drop of *S. mutans* biofilm formation in the presence of excess glucose was not significant ($P > 0.05$) for all fractions tested (Ag₄, Bd₂, Cs₄, and Ls₃).

3.5. Chemical Characterization of Fractions Constituents. The chemical composition of the selected EO and the selected active fractions is shown in Table 3.

TABLE 3: Major compounds of the selected active fractions from essential oils with their retention time (Rt), retention index (RI) and relative percentage.

i	Rt (min)	RI	Compounds	% Relative ¹							
				Ag EO	Ag ₄	Bd EO	Bd ₂	Cs EO	Cs ₄	Ls EO	Ls ₃
The selected compounds	4.02	899	cyclohexanone	-	-	-	-	-	-	6.5	-
	4.22	850	3-hexen-1-ol	-	-	-	0.8	3.6	5.1	-	-
	5.87	977	beta-pinene	12.0	-	-	-	-	-	-	-
	7.2	1024	p-cymene	-	-	-	-	-	-	17.3	-
	13.08	1140	Trans-pinocarveol	-	4.9	-	-	-	-	-	-
	14.09	1165	Trans-pinocamphone	16.0	36.7	-	-	-	-	-	-
	14.61	1177	Cis-pinocamphone	6.0	17.0	-	-	-	-	-	-
	16.7	1274	2-decen-1-ol <E>	-	-	-	-	23.6	26.9	-	-
	16.86	1277	1-decanol	-	-	-	-	33.9	35.4	-	-
	17.76	1299	Trans-pinocarvyl acetate	8.2	-	-	-	-	-	-	-
The selected compounds	19.74	1300	Thymol	-	-	-	-	-	-	65.8	97.8
	19.95	1303	Carvacrol	-	-	-	-	-	-	-	0.6
	21.84	1349	Ethyl ester benzenepropanoic	-	-	-	11.7	-	-	-	-
	22.57	1416	trans-caryophyllene	7.2	-	10.7	-	-	-	10.5	-
	24.86	1473	2-dodecen-1-ol	-	-	-	-	13.1	14.5	-	-
	25.04	14.78	germacrene D	-	-	4.9	-	-	-	-	-
	25.66	1493	bicyclogermacrene	4.2	-	6.8	-	-	-	-	-
	27.97	1553	M ² = 204	6.4	-	-	-	-	-	-	-
	30.59	1566	Trans-nerolidol	-	-	31.7	52.2	-	-	-	-
	31.05	1578	Spathulenol	-	-	13.6	11.5	-	-	-	-
The selected compounds	31.23	1582	Caryophyllene oxide	6.4	7.0	-	6.3	-	-	-	0.7
	31.9	1600	Guaiol	8.5	12.7	-	-	-	-	-	-
	33.44	1641	Epi alpha cadinol	-	-	-	3.09	-	-	-	-
	32.47	1674	2-tetradecen-1-ol <E>	-	-	-	-	5.5	5.2	-	-
	34.40	1668	Bulnesol	-	3.5	-	-	-	-	-	-

¹ The selected active fractions Ag₄, Bd₂, Cs₄, and Ls₃ had their actions against *S. mutans* biofilm and their antiproliferative activity evaluated. Ag EO, Bd EO, Cs EO, and Ls EO correspond to the following essential oils: *Aloysia gratissima*, *Baccharis dracunculifolia*, *Coriandrum sativum*, and *Lippia sidoides*, respectively. Only the compounds with relative percentage above 3% are listed.

² M: molecular weight of a non-identified compound.

The analyses of EO and fractions indicated the presence of volatile compounds, mainly mono- and sesquiterpenes.

We identified 28 compounds in the EO of *A. gratissima*, representing 92.73% of the EO, 25 compounds in the EO of *B. dracunculifolia*, representing 93.45% of the EO, 15 compounds in the EO of *C. sativum*, representing 91.93% of the EO, and four compounds in the EO of *L. sidoides*, representing 100% of the EO. We also identified 19 compounds in fraction

Ag₄, representing 94.6% of the fraction, 10 compounds in fraction Bd₂, representing 83.06% of the fraction, nine compounds in fraction Cs₄, representing 89.71% of the fraction, and five compounds in fraction Ls₃, representing 99.7% of the fraction.

The major compounds identified in each selected EO were: trans- and cis-pinocamphone, beta-pinene, and guaiol in *A. gratissima*; trans-nerolidol and spathulenol in *B. dracunculifolia*; 2-decen-1-ol and 1-decanol in *C. sativum*; and thymol in *L. sidoides*. The major compounds identified in each selected fractions were: trans- and cis-pinocamphone and guaiol in Ag₃; trans-nerolidol, spathulenol, and ethyl ester benzenepropanoic in Bd₂; 2-decen-1-ol and 1-decanol in Cs₄; and thymol in Ls₃.

3.6. Scanning Electron Microscopy (SEM). The effect of selected active fractions against *S. mutans* biofilm formation was evaluated by SEM. Figure 2 shows a reduction in biofilm formation. Biofilms were first developed as described previously (item 2.7.1), were treated with vehicle, or had their active fractions selected at concentrations able to inhibit more than 90% of *S. mutans* biofilm formation (Ag₄ at 62.5 µg/mL, Bd₂ and Cs₄ at 31.2 µg/mL, and Ls₃ at 125 µg/mL).

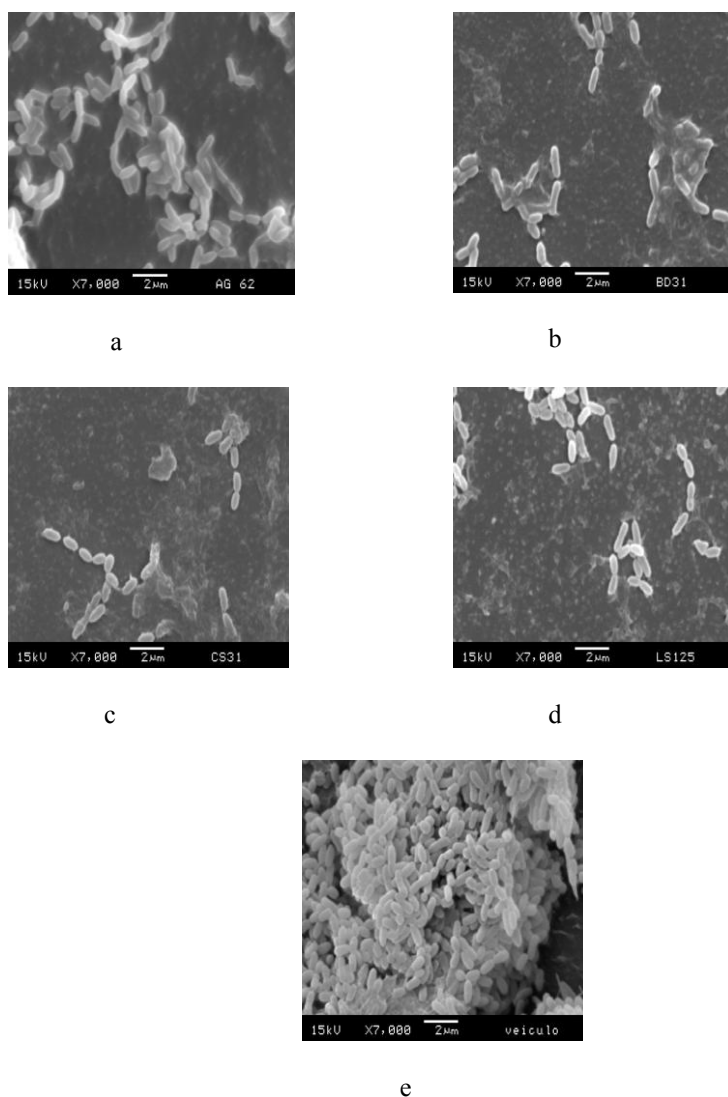


FIGURE 2: Scanning electron microscopy of *Streptococcus mutans* biofilms treated with the selected active fractions from selected essential oils and the vehicle. Images a, b, c, and d show the reduction of biofilm formation after treatment with Ag₄, Bd₂, Cs₄, and Ls₃ fractions, respectively, compared with the treatment with the vehicle (image e) (magnification of 7000x).

3.7. Antiproliferative Assay. Most EO and their selected active fractions did not present activity against the human normal cell line evaluated in this study or presented high concentrations to totally inhibit its growth. TGI values are shown in Table 4.

TABLE 4: Total growth inhibition (TGI) of selected essential oils and their selected active fractions tested against normal human cell and tumor cell lines.

Cell line	TGI ($\mu\text{g/mL}$) ¹								
	Ag EO	Ag ₄	Bd EO	Bd ₂	Cs EO	Cs ₄	Ls EO	Ls ₃	Dox
Glioma (U251)	>250	55.6	38.2	51.4	8.3	61.5	>250	94.9	0.92
Breast (MCF-7)	>250	45.2	46.0	67.7	13.6	111.6	>250	56.6	3.3
Ovarian (NCI-ADR/RES)	>250	50.6	59.2	10.5	90.0	13.1	>250	112.3	1.6
Kidney (786-O)	>250	5.9	49.5	47.1	29.8	72.1	>250	26.7	>250
Lung (NCI-H460)	>250	42.7	87.6	76.8	105.0	110.3	>250	79.8	4.9
Prostate (PC-3)	99.9	>250	> 250	>250	118.1	141.9	26.7	>250	11.7
Ovarian (OVCAR-3)	< 0.25	47.6	< 0.25	58.0	< 0.25	73.7	< 0.25	60.4	7.6
Keratinocytes (HaCaT)	>250	>250	92.3	95.7	129.4	145.6	>250	>250	2.3

¹ Data result from three replicates per treatment in two independent tests at 25°C for 48 hours. Ag EO, Bd EO, Cs EO, and Ls EO correspond to the following essential oils: *Aloysia gratissima*, *Baccharis dracunculifolia*, *Coriandrum sativum*, and *Lippia sidoides*, respectively. Ag₄, Bd₂, Cs₄, and Ls₃ are the selected active fractions evaluated. Dox: doxorubicin (positive control).

Among the EO evaluated, *B. dracunculifolia* and *C. sativum* were the most active inhibitors of human tumor cell lines growth, presenting selectivity for U251 (TGI = 38.2 µg/mL and TGI = 8.3 µg/mL, respectively) and OVCAR-3 (TGI < 0.25 µg/mL for both). On the other hand, *A. gratissima* and *L. sidoides* displayed the lowest activity, both presenting selectivity for OVCAR-3 (TGI < 0.25 µg/mL for both) and *L. sidoides* for PC-3 (TGI = 26.7 µg/mL). The reference compound, doxorubicin, presented antiproliferative activity against all cell lines, excepted Kidney, (Table 4).

Table 4 also shows the activity of selected active fractions. Ag₄ and Ls₃ fractions presented better results than *A. gratissima* and *L. sidoides* EO, respectively, since these fractions were not active against human normal cell lines (TGI > 250 µg/mL) and showed lower TGI values, being selective for 786-0 (TGI = 5.9 µg/mL and TGI = 26.7 µg/mL, respectively). Cs₄ fraction had better results than *C. sativum* EO only against NCI-ADR/RES (TGI = 13.1 µg/mL and TGI = 90 µg/mL, respectively). Bd₂ displayed a better performance than *B. dracunculifolia* EO against NCI-ADR/RES (TGI = 10.5 µg/mL and TGI = 59.2 µg/mL, respectively), 786-O (TGI = 47.1 µg/mL and TGI = 49.5 µg/mL, respectively), and NCI-H460 (TGI = 76.8 µg/mL and TGI = 87.6 µg/mL, respectively).

4. Discussion

The activity of natural products, especially EO, against microorganisms has been recently confirmed by several studies focusing on antimicrobial activity of EO against planktonic cells. However, bacteria growing in biofilms exhibit a specific phenotype and are often, but not always, more resistant to antimicrobial agents than their planktonic counterparts [10, 11]. Thus it is important to search for natural products that have antibiofilm properties and antimicrobial activity against oral pathogens [28].

This study aimed to evaluate the activity of EO and their fractions against planktonic cells of *S. mutans* and the active fractions were evaluated against biofilm formed by *S. mutans*.

Also, EO and their active fractions were chemically characterized and their activity against human normal and tumor cell lines proliferation were determined.

The antimicrobial assay revealed low MIC values for almost all 20 EO and 15 fractions from the selected EO tested. EO and the selected active fractions presented strong activity against *S. mutans*, since natural products are considered strong inhibitors of microbial activity when MIC values are lower than 500 µg/mL [29].

These results demonstrate that the EO studied and especially those selected (*A. gratissima*, *B. dracunculifolia*, *C. sativum*, and *L. sidoides*) have potential for bioprospection of new active biomolecules. The fractionation process adopted showed good results since the fractions obtained were more active than the original EO (Table 2). This bioguided study is a model for bioprospecting new drugs [30], and it can be considered successful since we found active fractions presenting higher activity than their respective EO.

Most EO and fractions studied showed MBC:MIC ratio that enables them to be classified as bactericidal compounds. This could be explained by their hydrophobicity, an important characteristic that exists in EO and their fractions [31] and may allow them to partition the lipids of the bacterial cell membrane, turning them more permeable and leading to leakage of ions and other cell constituents [32, 33]. On the other hand, *B. dracunculifolia* EO and its selected active fraction (Bd₂) present compounds that could be capable of infiltrating the cell and interact with cellular metabolic mechanisms [34], demonstrating their bacteriostatic effect. Nevertheless, despite presenting bactericidal or bacteriostatic effect, the selected EO proved to be active against both *S. mutans* planktonic cells and biofilm, demonstrating the effectiveness of the substances present in these EO, since it is difficult to disrupt *S. mutans* biofilm [35].

The selected active fractions were also tested against *S. mutans* biofilm and they were able to disrupt its formation at all tested concentrations. This disruption was observed using

SEM, which showed the change the selected active fractions caused in the structure of *S. mutans* biofilm.

At the concentrations tested, it was possible to observe huge failures in *S. mutans* biofilm surface treated with the active fractions when compared with the treatment with the vehicle, which presented a more homogeneous biofilm surface. These changes were also observed in another study that tested the action of *C. sativum* and its bioactive fraction against *Candida albicans* [11]. Moreover, the simple conformational change in biofilm, caused by the action of the selected active fractions, could make it more susceptible and less virulent [4].

However, when the selected active fractions were tested in order to evaluate their ability to reduce *S. mutans* acid production, no significant results were observed ($p > 0.05$). Therefore, the selected active fractions could not act on this important virulence factor of *S. mutans*, different from the findings of another work with *B. dracunculifolia* extracts, which showed significant reduction in production of acid by this microorganism [36]. The difference between *B. dracunculifolia* EO and the active extracts from this plant may be attributed to the extraction method, which results in different compound mixtures with different mechanisms of action [37].

It is known that EO are composed of numerous different chemical compounds and their antimicrobial activity might be attributed to several different mechanisms, which could explain the variations in their mode of action [38].

The present data suggest the occurrence of a separation during the fractionation process of the selected EO in such a way that the selected active fractions presented higher amounts of bioactive compounds than their respective EO. The main biologically active compounds found in the selected active fractions were: thymol, carvacrol, 2-decen-1-ol, trans-nerolidol, spathulenol, ethyl ester benzenepropanoic, trans-pinocamphone, cis-pinocamphone, and guaiol. These compounds have been extensively described in the literature for their effect on microorganisms [39, 40].

Both forms of pinocamphone – cis and trans – are major constituents of Ag₄ fraction and were also found in *Hyssopus officinalis* L. EO [41]. These compounds are responsible for the antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of *H. officinalis* EO, demonstrating that they pass through the cell wall and the plasma membrane, disrupting their structure [41]. The bactericidal activity of Ag₄ fraction observed in the present study may be a consequence of this mode of action.

Trans-nerolidol and spathulenol, two compounds present in Bd₂ fraction, have been considered active against Gram-positive and Gram-negative bacteria unknown [13]. Although spathulenol shows activity against *S. mutans*, its mechanism of action still remains unknown [13].

Other studies showed that certain alcohols, such as 2-decen-1-ol, have higher antimicrobial activity than aldehydes against *Candida* ssp. [11, 16]. These alcohols were found in Cs₄ fraction and may be responsible for the action against *S. mutans* biofilm. Furthermore, considering the mode of action of *C. sativum* EO, it seems to result in bacterial cell permeabilization, leading to the impairment of other cell functions, such as membrane potential, respiratory activity, or efflux pump activity [42].

Thymol is an optic isomer of carvacrol and both substances seem to make bacterial membrane more permeable [43]. In our study, both were found in Ls₃ fraction as its major components. Previous studies have shown that these compounds present antimicrobial activity against fungi and bacteria [44], including species of the genus *Streptococcus* [12].

After determining the antimicrobial activity of a natural product, it is important to verify if it also exhibits antiproliferative activity, mainly after its fractionation, a procedure that may concentrate toxic compounds in the fractions that present biological activity.

Based on TGI values, the selected EO and selected active fractions could be classified as inactive (TGI > 50 µg/mL), weakly active (15 µg/mL < TGI < 50 µg/mL), moderately active

(6.25 $\mu\text{g/mL}$ < TGI < 15 $\mu\text{g/mL}$), and strongly active (TGI < 6.25 $\mu\text{g/mL}$) [45]. The absence of activity was clearly observed in this study since all selected EO and selected active fractions were inactive against the human normal cell line tested.

All EO tested were selective against the ovarian tumor cell line, showing potent activity. Ag₄ showed potent activity against the kidney tumor cell line, and Bd₂ and Cs₄ fractions showed only moderate activity against the ovarian tumor cell line. These results show the specificity of these EO and their fractions against some tumor cell lines, an important and desired characteristic for potential new chemotherapeutic drugs [15].

It is known that EO compounds, such as monoterpenes, have shown effects on mevalonate metabolism, linked to the maintenance of cell membrane, which could contribute to terpene tumor suppressive action [46]. Thereby, the presence of monoterpenes in the selected active fractions of our study may explain their antiproliferative actions against some tumor cell lines [47]; however, more studies are required to find the compounds of EO responsible for their anticancer activity, since little is known about essential oils their antiproliferative activity.

5. Conclusion

The results of the present study indicate that all EO and fractions tested showed good antimicrobial activity, but only those showing activity at low concentrations were taken into consideration and fractionated for bioprospection of new agents against *S. mutans*. Among these fractions, the selected active fractions were able to disrupt *S. mutans* biofilm formation, did not inhibit normal cell line growth, and were more specific against human tumor cell lines. These features enable them to be tested in further studies and help the discovery of new bioactive molecules.

6. Acknowledgment

The authors thank São Paulo Research Foundation (FAPESP, #2009/12353-0 and #2011/14757-0) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, #308644/2011-5) for the financial support.

References

- [1] Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação Nacional de Saúde Bucal. *Projeto SB Brasil 2010 – Pesquisa Nacional de Saúde Bucal. Primeiros resultados*, Brasília, DF, Brazil, 2011.
- [2] P. D. Marsh, “Are dental diseases examples of ecological catastrophes?”, *Microbiology*, vol. 149, no. 2, pp. 279–294, 2003.
- [3] W. H. Bowen, S. M. Amsbaugh, S. Monell-Torrens, J. Brunelle, H. Kuzmiak-Jones, and M. F. Cole, “A method to assess cariogenic potential of foodstuff”, *Journal of the American Dental Association*, vol. 100, no. 5, pp. 677–681, 1980.
- [4] J. K. Kajfasz, I. Rivera-Ramos, J. Abranches et al., “Two Spx proteins modulate stress tolerance, survival, and virulence in *Streptococcus mutans*”, *Journal of Bacteriology*, vol. 192, no. 10, pp. 2546–2556, 2010.
- [5] D. Ajdić, W. M. McShan, R. E. McLaughlin et al., “Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 22, pp. 14434–14439, 2002.
- [6] T. M. S. Alves, C. A. Silva, N. B. Silva, E. B. Medeiros, and A. M. G. Valença, “Atividade antimicrobiana de produtos fluoretados sobre bactérias formadoras do biofilme dentário: estudo *in vitro*”, *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, vol. 10, no. 2, pp. 209–216, 2010.
- [7] J. D. Bader, D. A. Shugars, and A. J. Bonito, “Systematic reviews of selected dental caries diagnostic and management methods”, *Journal of Dental Education*, vol. 65, no. 10, pp. 960–968, 2001.
- [8] J. Clardy and C. Walsh, “Lessons from natural molecules”, *Nature*, vol. 432, no. 7019, pp. 829–837, 2004.

- [9] J. G. Jeon, P. L. Rosalen, M. L. Falsetta, and H. Koo, “Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective”, *Caries Research*, vol. 45, no. 3, pp. 243–263, 2011.
- [10] M. Simões, “Antimicrobial strategies effective against infectious bacterial biofilms”, *Current Medicinal Chemistry*, vol. 18, no. 14, pp. 2129–2145, 2011.
- [11] V. F. Furletti, I. P. Teixeira, G. Obando-Pereda et al., “Action of *Coriandrum sativum* L. essential oil upon oral *Candida albicans* biofilm formation”, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2011, Article ID 985832, 9 pages, 2011. doi:10.1155/2011/985832.
- [12] M. A. Botelho, N. A. P. Nogueira, G. M. Bastos et al., “Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens”, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 40, no. 3, pp. 349–356, 2007.
- [13] F. Silva, “Efeito antimicrobiano *in vitro* dos compostos isolados da *Mikania glomerata* sobre os patógenos orais”, [Senior Research Project], Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, Piracicaba, SP, Brazil, 2005.
- [14] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck and M. Idaomar, “Biological effects of essential oils – A review”, *Food and Chemical Toxicology*, vol. 46, pp. 446-75, 2008.
- [15] J. E. Carvalho, “Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese”, *Construindo a História dos Produtos Naturais*, vol. 7, pp. 1–18, 2006.
- [16] A. F. Begnami, M. C. T. Duarte, V. Furletti, and V. L. G. Rehder, “Antimicrobial potential of *Coriandrum sativum* L. against different *Candida* species *in vitro*”, *Food Chemistry*, vol. 118, no. 1, pp. 74–77, 2010.
- [17] R. P. Adams, *Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectrometry*, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA, 2007.

[18] Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard – seventh edition. CLSI document M07-A7, vol. 26, no. 2.* Wayne, PA, USA, 2006.

[19] S. P. Soares, A. H. C. Vinholis, L. A. Casemiro, M. L. A. Silva, W. R. Cunha, and C. H. G. Martins, “Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Stryphnodendron adstringens* sobre microorganismos da cárie dental”, *Revista Odonto Ciência*, vol. 23, no. 2, pp. 141–144, 2008.

[20] Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard – eighth edition. CLSI document M07-A8, vol. 29, no. 2.* Wayne, PA, USA, 2009.

[21] H. Koo, M. F. Hayacibara, B. D. Schobel et al., “Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and *tt*-farnesol”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 52, no. 5, pp. 782–789, 2003.

[22] R. O. Mattos-Granner, S. Jin, W. F. King, T. Chen, D. J. Smith, and M. J. Duncan, “Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates”, *Infection and Immunity*, vol. 69, no. 11, pp. 6931–6941, 2001.

[23] S. Duarte, P. L. Rosalen, M. F. Hayacibara et al., “The influence of a novel propolis on *mutans streptococci* biofilms and caries development in rats”, *Archives of Oral Biology*, vol. 51, no. 1, pp. 15–22, 2006.

[24] S. P. Hawser and L. J. Douglas, “Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*”, *Infection and Immunity*, vol. 62, no. 3, pp. 915–921, 1994.

- [25] A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan et al., “Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines”, *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 83, no. 11, pp. 757–766, 1991.
- [26] R. H. Shoemaker, “The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen”, *Nature Reviews. Cancer*, vol. 6, no. 10, pp. 813–823, 2006.
- [27] C. Denny, M. E. Zacharias, A. L. T. G. Ruiz et al., “Antiproliferative properties of polyketides isolated from *Virola sebifera* leaves”, *Phytotherapy Research*, vol. 22, no. 1, pp. 127–130, 2008.
- [28] H. Koo, B. P. F. A. Gomes, P. L. Rosalen, G. M. B. Ambrosano, Y. K. Park, and J. A. Cury, “*In vitro* antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens”, *Archives of Oral Biology*, vol. 45, no. 2, pp. 141–148, 2000.
- [29] M. C. Duarte, E. E. Leme, C. Delarmelina, A. A. Soares, G. M. Figueira, and A. Sartoratto, “Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*”, *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 111, no. 2, pp. 197–201, 2007.
- [30] L. M. C. Simões, L. E. Gregório, A. A. Silva Filho et al., “Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils”, *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 94, no. 1, pp. 59–65, 2004.
- [32] S. Burt, “Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review”, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 94, no. 3, pp. 223–253, 2004.
- [32] K. Knobloch, H. Weigand, N. Weis, H. M. Schwarm, and H. Vigneschow, “Action of terpenoids on energy metabolism,” in *Progress in essential oil research: 16th International Symposium on Essential Oils*, E. J. Brunke, Ed., pp. 429–445, De Gruyter, Berlin, Germany, 1986.

- [33] A. Ultee, M. H. J. Bennink, and R. Moezelaar, "The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 4, pp. 1561–1568, 2002.
- [34] M. Marino, C. Bersani, and G. Comi, "Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*", *International Journal of Food Microbiology*, vol. 67, no. 3, pp. 187–195, 2001.
- [35] P. D. Marsh, "Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style", *Journal of Clinical Periodontology*, vol. 32, suppl. 6, pp. 7–15, 2005.
- [36] D. P. S. Leitão, A. A. Silva Filho, A. C. M. Polizello, J. K. Bastos, and A. C. C. Spadaro, "Comparative evaluation of in-vitro effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 27, no. 11, pp. 1834–1839, 2004.
- [37] J. N. Eloff, "Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?", *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 60, no. 1, pp. 1–8, 1998.
- [38] S. Calsamiglia, M. Busquet, P. W. Cardozo, L. Castillejos, and A. Ferret, "Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation", *Journal of Dairy Science*, vol. 90, no. 6, pp. 2580–2595, 2007.
- [39] I. H. N. Bassole, R. Nebie, A. Savadogo, C. T. Ouattara, N. Barro, and S. A. Traore, "Composition and antimicrobial activities of the leaf and flower essential oils of *Lippia chevalieri* and *Ocimum canum* from Burkina Faso", *African Journal of Biotechnology*, vol. 4, no. 10, pp. 1156–1160, 2005.
- [40] N. A. Parreira, L. G. Magalhães, D. R. Moraes et al., "Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*", *Chemistry and Biodiversity*, vol. 7, no. 4, pp. 993–1001, 2010.

- [41] S. Kizil, N. Haşimi, V. Tolan, E. Kiliç, and H. Karatas, “Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) essential oil”, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, vol. 38, no. 3, pp. 99–103, 2010.
- [42] F. Silva, S. Ferreira, J. A. Queiroz, and F. C. Domingues, “Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry”, *Journal of Medical Microbiology*, vol. 60, no. 10, pp. 1479–1486, 2011.
- [43] R. J. W. Lambert, P. N. Skandamis, P. J. Coote, and G. J. E. Nychas, “A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol”, *Journal of Applied Microbiology*, vol. 91, no. 3, pp. 453–462, 2001.
- [44] E. Lacoste, J. P. Chaumont, D. Mandin, M. M. Plumel, and F. J. Matos, “Antiseptic properties of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: application to the cutaneous microflora”, *Annales Pharmaceutiques Françaises*, vol. 54, no. 5, pp. 228–230, 1996.
- [45] G. Fouche, G. M. Cragg, P. Pillay, N. Kolesnikova, V. J. Maharaj, and J. Senabe, “*In vitro* anticancer screening of South African plants”, *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 119, no. 3, pp. 455–461, 2008.
- [46] K. M. Swanson and R. J. Hohl. “Anti-cancer therapy: targeting the mevalonate pathway”, *Current Cancer Drug Targets*, vol. 6, no. 1, pp. 15–37, 2006.
- [47] A. E. Edris, “Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review”, *Phytotherapy Research*, vol. 21, no. 4, pp. 308–323, 2007.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados pode-se concluir que:

- 1) Todos os OE testados e suas frações tiveram boa atividade antimicrobiana, mas apenas os que mostraram-se ativos em baixas concentrações foram selecionados e fracionados para bioprospecção de novas drogas contra *S. mutans*, o principal agente etiológico da cárie;
- 2) Dentre as frações obtidas, as ativas selecionadas foram capazes de interferir na formação de biofilme de *S. mutans*, mas não foram capazes de interferir em um importante fator de virulência dessa bactéria que é a produção de ácidos em presença de glicose; e
- 3) Estas frações ativas também mostraram-se inativas contra a linhagem celular normal testada e mostraram-se seletivas contra algumas linhagens celulares humanas tumorais.

Estes resultados, permitem, após estudos complementares, classificar estas frações como uma promessa para o descobrimento de novas moléculas bioativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS (DATASUS). Levantamento Epidemiológico em Saúde Bucal - Cárie Dental – 1996. Brasília: Ministério da Saúde; 1996 [acesso 2009 Jun 6]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/>.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Programas Especiais de Saúde. Divisão Nacional de Saúde Bucal. Fundação Serviços de Saúde Pública. Levantamento epidemiológico em saúde bucal: Brasil, zona urbana, 1986. Brasília: Centro de Documentação do Ministério da Saúde; 1988.
3. Butler MS. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat Prod Rep*. 2005; 22(2): 162-95.
4. Dantas S, Oliveira AGRC, Frazão P, Ely HC, Araújo IC, Pattussi MP. Como está o sorriso do Brasil? *Rev ABO Nac*. 2000; 8(3): 134-5.
5. Dinelli W, Corona SAM, Dinelli TC, Garcia PPNS. Desenvolvimento, aplicação e avaliação de um programa de orientação sobre higiene bucal junto à pré-escolares. *Stoma*. 2000; 13(57): 27-30.
6. Drumond MRS, Castro RD, Almeida RVD, Pereira MSV, Padilha WWN. Estudo Comparativo in vitro da Atividade Antimicrobiana de Produtos Fitoterápicos. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr*. 2004; 4(1): 33-8.
7. Funari CS, Ferro VO. Ethical use of the Brazilian biodiversity: necessity and opportunity. *Rev Bras Farmacogn*. 2005; 15(2):178-82.
8. Garcia ES, Silva ACP, Gilbert B, Corrêa CBV, Cavalheiro MVS, Santos RR, Tomasini T. Fitoterápicos. Campinas: André Tosello; 1996.
9. Inamul H. Safety of medicinal plants. *Pakistan Journal of Medical Research*. 2004; 43(4).
10. Lakmichi H, Bakhtaoui FZ, Gadhi CA, Ezoubeiri A, Jahiri YE, M AE, Zrara I, K L. Toxicity Profile of the Aqueous Ethanol Root Extract of *Corrigiola telephiifolia* Pourr. (Caryophyllaceae) in Rodents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011. Article ID 317090, 10 pages. doi:10.1155/2011/317090.
11. Lemos JAC, Abranches J, Burne RA. Responses of Cariogenic Streptococci to Environmental stresses. *Curr. Issue Mol. Biol*. 2005; 7: 95-108.
12. Løe H. Controle de placa na doença periodontal. *RGO*. 1978; 2(1): 28-31.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

13. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev. 1986; 50(4): 353-80.
14. Loretto NRM, Seixas ZA, Jardim MC, Brito RL. Cárie dentária no Brasil: alguns aspectos sociais, políticos e econômicos. Rev ABO Nac. 2000; 8(1): 45-9.
15. Lupe FA. Estudo da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia [dissertação]. Campinas: IQ/UNICAMP; 2007.
16. Macpherson LM, Macfarlane TW, Geddes DAM, Stephen KW. Assessment of the cariogenic potential of *Streptococcus mutans* strains and its relationship to *in vivo* caries experience. Oral Microbiol Immunol. 1992; 7(3): 142-7.
17. Maffei ME, Gertsch J, Appendino G. Plant volatiles: Production, function and pharmacology. Nat. Prod. Rep. 2011; 28: 1359-80.
18. Marinho VA, Pereira GM. Cárie: diagnóstico e plano de tratamento. Rev Univ Alfenas. 1998; 4: 27-37.
19. Martins MD, Araújo RGD, Veloso NF. Avaliação das necessidades de tratamento odontológico de crianças de baixa renda. JBP J Bras Odontopediatr Odontol Bebe. 1999; 2(6): 132-6.
20. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. J Nat Prod. 2007; 70(3): 461-77.
21. Oliveira RAG, Lima EO, Vieira WL, Freire KRL, Trajano VN, Lima IO *et al.* Estudo da interferência de óleos essenciais sobre alguns antibióticos usados na clínica. Rev Bras Farmacogn. 2006; 16: 77-82.
22. Peiris V, Oppenheim BA. Antimicrobial activity of cytotoxic drugs may influence isolation of bacteria and fungi from blood cultures. J Clin Pathol. 1993; 46: 1124-25.
23. Quiroga EM, Sampietro DA, Soberón JR, Sgariglia MA, Vattuone MA. Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. J Appl Microbiol. 2006; 101(1): 103-10.
24. Roskin DW, Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. Biochemica et Biophysica. 2008; 357-75.
25. Simões CMO, Schenkel EP, Gossmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3 ed. Florianópolis: Editora UFSC; 2001
26. Simões CMO, Schenkel EP, Gossmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 5.ed. Florianópolis: Editora UFSC; 2003.
27. Soares AKA, Carmo GC, Quental DP, Nascimento DF, Bezerra FAF, Moraes MO, Moraes MEA. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*,

Nasturtium officinale, própolis e mel em voluntários saudáveis. 2006; *Rev Bras Farmacogn* 16: 447-454.

28. Suttman H, Retz M, Paulsen F, Harder J, Zwergel U, Kamradt J, Wullich B, Unteregger G, Stöckle M, Lehmann J. Antimicrobial peptides of the Cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells *BMC Urology* 2008, 8:5 doi:10.1186/1471-2490-8-5

29. Ten Cate JM, Marsh PD. Procedures for establishing efficacy of antimicrobial agents for chemotherapeutic caries prevention. *J Dent Res*. 1994; 73(3): 695-703.

30. Weyne SC. A construção do paradigma de promoção de saúde: um desafio para as novas gerações. In: Kriger L, coordenador. ABOPREV: promoção de saúde bucal. São Paulo: Artes Médicas; 1997. p.1-26.

31. Yoshizumi AO, Liechocki DGL, Tanaka GY, Ferreira CFG, Benelli EM. Efeitos de diferentes nutrientes na estrutura do biofilme dental formado *in situ* e *in vitro* por *streptococcus mutans* [Resumo]. *Revista Dens*. 2007; 15(2): 2.

APÊNDICE

Tabela 1. Dados de umidade, massa da plantas fresca e massa do óleo obtida após a hidrodestilação que foram úteis para o cálculo do rendimento.

Espécie Medicinal	No. CPMA	Umidade (%)	Massa da planta Fresca (g)	Massa do óleo (g)	Rendimento em óleo (%)
<i>Aloysia gratissima</i> (Giil & Hook)	714	67,01	1196	4,3556	1,1
<i>Aloysia triphylla</i> (L'Hér.) Britton	274/700	70,22	889	1,6787	0,27
<i>Alpinia speciosa</i> (Pers.) Burt & Smith	447	76,13	1930	0,9946	0,22
<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC	1841	39,25	1020	3,2023	0,8
<i>C. martini</i> (Roxb.) J.F. Watson	354	42,01	907,36	5,3421	0,59
<i>C. winterianus</i> Jowitt.	712	47,18	446,75	3,1295	1,48
<i>Cinnamomum zeilanicus</i> Blume	455	49,69	814	0,8918	0,22
<i>Coriandrum sativum</i> L.	664	90,79	12080	3,2316	0,29
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf	503	23,78	930,36	2,5045	1,13
<i>Cyperus articulatus</i> Vahl	222	57,99	1394	2,9604	0,5
<i>Elyonurus muticus</i> Spreng	1701	52,62	1347	3,9115	0,61
<i>Eugenia florida</i> DC.	1685	18,78	661	0,4209	0,34
<i>Eugenia uniflora</i>	1816	21,6	796	4,7537	0,76
<i>L. sidoides</i> Cham.	398/399	60,51	655	12,0979	4,67
<i>Lippia alba</i> (Mill) N.E. Brown	467/509	75,68	554,22	0,412	0,3
<i>Mentha piperita</i> L.	560	76,68	350,18	1,8943	2,22
<i>Mikania glomerata</i> Spreng	766	82,7	1718	1,1981	0,4
<i>Siparuna guaianenses</i> Albl.	2025	36,78	1250	2,31	0,29
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.					
M. Perry	455	87,93	1500	6,0714	0,46
<i>Ziziphus joazeiro</i> Mart	2119	30,27	400	0,557	0,46

ANEXOS

Anexo 1 - Informação CCPG/002/06. Trata do Formato Padrão das Dissertações de Mestrado e Teses de Doutorado da UNICAMP.

INFORMAÇÃO CCPG/002/06

Tendo em vista a necessidade de revisão da regulamentação das normas sobre o formato e a impressão das dissertações de mestrado e teses de doutorado e com base no entendimento exarado no Parecer PG nº 1985/96, que trata da possibilidade do formato alternativo ao já estabelecido, a CCPG resolve:

Artigo 1º - O formato padrão das dissertações e teses de mestrado e doutorado da UNICAMP deverão obrigatoriamente conter:

- I. Capa com formato único ou em formato alternativo que deverá conter informações relativas ao nível (mestrado ou doutorado) e à Unidade de defesa, fazendo referência à Universidade Estadual de Campinas, sendo o projeto gráfico das capas definido pela PRPG.
- II. Primeira folha interna dando visibilidade à Universidade, a Unidade de defesa, ao nome do autor, ao título do trabalho, ao número de volumes (quando houver mais de um), ao nível (mestrado ou doutorado), a área de concentração, ao nome do orientador e co-orientador, ao local (cidade) e ao ano de depósito. No seu verso deve constar a ficha catalográfica.
- III. Folha de aprovação, dando visibilidade à Comissão Julgadora com as respectivas assinaturas.
- IV. Resumo em português e em inglês (ambos com no máximo 500 palavras).
- V. Sumário.
- VI. Corpo da dissertação ou tese dividido em tópicos estruturados de modo característico à área de conhecimento.
- VII. Referências, formatadas segundo normas de referenciamento definidas pela CPG da Unidade ou por critério do orientador.
- VIII. Todas as páginas deverão, obrigatoriamente, ser numeradas, inclusive páginas iniciais, divisões de capítulos, encartes, anexos, etc... As páginas iniciais poderão ser numeradas utilizando-se algarismos romanos em sua forma minúscula.
- IX. Todas as páginas com numeração "ímpar" serão impressas como "frente" e todas as páginas com numeração "par" serão impressas como "verso".

§ 1º - A critério do autor e do orientador poderão ser incluídos: dedicatória; agradecimento; epígrafe; lista de: ilustrações, tabelas, abreviaturas e siglas, símbolos; glossário; apêndice; anexos.

§ 2º - A dissertação ou tese deverá ser apresentada na língua portuguesa, com exceção da possibilidade permitida no artigo 2º desta Informação.

§ 3º - As dissertações e teses cujo conteúdo versar sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou biossegurança, deverão apresentar anexos os respectivos documentos de aprovação.

Artigo 2º - A critério do orientador e com aprovação da CPG da Unidade, os capítulos e os apêndices poderão conter cópias de artigos de autoria ou de co-autoria do candidato, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, escritos no idioma exigido pelo veículo de divulgação.

§ único - O orientador e o candidato deverão verificar junto às editoras a possibilidade de inclusão dos artigos na dissertação ou tese, em atendimento à legislação que rege o direito autoral, obtendo, se necessária, a competente autorização, deverão assinar declaração de que não estão infringindo o direito autoral transferido à editora.

Artigo 3º - Dependendo da área do conhecimento, a critério do orientador e com aprovação da CPG da Unidade, a dissertação ou tese poderá ser apresentada em formato alternativo, desde que observados os incisos I, II, III, IV, V e VII do artigo 1º.

Artigo 4º - Para impressão, na gráfica da Unicamp, dos exemplares definitivos de dissertações e teses defendidas, deverão ser adotados os seguintes procedimentos:

§ 1º - A solicitação para impressão dos exemplares de dissertações e teses poderá ser encaminhada à gráfica da Unicamp pelas Unidades, que se responsabilizarão pelo pagamento correspondente.

§ 2º - Um original da dissertação ou tese, em versão definitiva, impresso em folha tamanho carta, em uma só face, deve ser encaminhado à gráfica da Unicamp acompanhado do formulário "Requisição de Serviços Gráficos", onde conste o número de exemplares solicitados.

§ 3º - A gráfica da Unicamp imprimirá os exemplares solicitados com capa padrão. Os exemplares solicitados serão encaminhados à Unidade em, no máximo, cinco dias úteis.

§ 4º - No formulário "Requisição de Serviços Gráficos" deverão estar indicadas as páginas cuja reprodução deva ser feita no padrão "cores" ou "foto", ficando entendido que as demais páginas devam ser reproduzidas no padrão preto/branco comum.

§ 5º - As dissertações e teses serão reproduzidas no padrão frente e verso, exceção feita às páginas iniciais e divisões de capítulos; dissertações e teses com até 100 páginas serão reproduzidas no padrão apenas frente, exceção feita à página que contém a ficha catalográfica.

§ 6º - As páginas fornecidas para inserção deverão ser impressas em sua forma definitiva, ou seja, apenas frente ou frente/verso.

§ 7º - O custo, em reais, de cada exemplar produzido pela gráfica será definido pela Administração Superior da Universidade.

Artigo 5º - É obrigatória a entrega de dois exemplares para homologação.

Artigo 6º - Esta Informação entrará em vigor na data de sua publicação, ficando revogadas as disposições em contrário, principalmente as Informações CCPG 001 e 002/98 e CCPG/001/00.

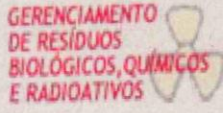
Campinas, 13 de setembro de 2006

Profa. Dra. Teresa Dib Zambon Atvars
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação

Anexo 2. Certificado de aprovação do Comitê de Ética Ambiental – Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP.



Universidade Estadual de Campinas
Coordenadoria Geral da Universidade
Comissão de Ética Ambiental



GERENCIAMENTO
DE RESÍDUOS
BIOLÓGICOS, QUÍMICOS
E RADIOATIVOS

Cidade Universitária "Zeferino Vaz", 16 de dezembro de 2009.

Of. CGU/Resíduos/ Comissão de Ética Ambiental 324/2009

Ao
Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Universidade Estadual de Campinas

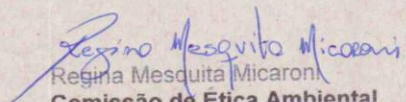
Referência: PARECER SOBRE RESÍDUO DE PROJETO FAPESP 2009 -
Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas contra
microrganismo do grupo mutans.

Prezado Prof. Dr. Pedro Luiz,

Segue, em anexo, o parecer sobre a destinação final dos resíduos a serem
gerados no projeto: Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de
plantas contra microrganismo do grupo mutans, conforme informações enviadas à
Comissão de Ética Ambiental da UNICAMP em 13/11/09.

Recomendamos a aprovação da destinação dada ao resíduo: incineração
de diclorometano e acetato de etila. Lembramos que caso venha a ser gerado
resíduo com contaminação biológica, o mesmo deverá ser tratado de acordo com
as diretrizes do Grupo Gestor de Resíduos Perigosos da UNICAMP.

Atenciosamente,



Regina Mesquita Micaroni
Comissão de Ética Ambiental
Universidade Estadual de Campinas



Universidade Estadual de Campinas
Coordenadoria Geral da Universidade
Comissão de Ética Ambiental

GERENCIAMENTO
DE RESÍDUOS
BIOLÓGICOS, QUÍMICOS
E RADIOATIVOS

Número do Processo na Comissão de Ética Ambiental da UNICAMP: 84/2009

IDENTIFICAÇÃO

- 1.Unidade: Faculdade de Odontologia de Piracicaba - FOP
- 2.Pesquisador responsável: Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
- 3.Título do Projeto: Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas contra microrganismo do grupo mutans.
- 4.Agência de Fomento: FAPESP

PARECER DO ASSESSOR

A natureza dos resíduos listados é condizente com as atividades previstas no projeto? Comente.

Sim, pois este projeto visa estudar a atividade antimicrobiana in vitro de óleos essenciais de espécimes da "Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas" do CPQBA/UNICAMP, contra *Streptococos* do grupo mutans, principais agentes responsáveis pela cárie. Deste modo, está prevista a geração dos seguintes resíduos químicos: diclorometano e acetato de etila. Há a possibilidade de geração de resíduo biológico, visto que a atividade antimicrobiana será estudada.

A quantidade de resíduos estimada é condizente com as atividades do projeto? Comente.

Sim, uma vez que a quantidade estimada de resíduo químico gerado é de cerca de 20 kg, a qual é compatível com as atividades descritas no projeto. O custo previsto para o tratamento é de R\$ 3,00/kg, ficando dentro da ordem de grandeza paga pela UNICAMP para incineração.

O(s) tratamento(s), a destinação final e o orçamento são adequados?

Sim, pois os compostos orgânicos: diclorometano e acetato de etila podem ser incinerados. Lembramos que caso venha a ser gerado resíduo com contaminação biológica, o mesmo deverá ser tratado de acordo com as diretrizes do Grupo Gestor de Resíduos.

Comentários, críticas e sugestões.

Recomendamos que os reagentes residuais cujas gerações sejam preestabelecidas devido ao emprego de reagentes específicos sejam descritos e as metodologias de tratamento indicadas.

Recomendamos a aprovação da destinação proposta para os resíduos de solventes. Os tratamentos dos reagentes residuais serão avaliados quando os mesmos puderem ser especificados.

Local: Campinas

Data: 16/12/09

Regina Mesquita Micaroni
Regina Mesquita Micaroni

Comissão de Ética Ambiental
Universidade Estadual de Campinas

Anexo 3. Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - Faculdade e Odontologia de Piracicaba/UNICAMP.

Comitê de Ética em Pesquisa - Certificado

25/01/12 17:42



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais sobre patógenos bucais"**, protocolo nº 087/2011, dos pesquisadores Livia Câmara de Carvalho Galvão, Ana Lúcia Tasca Góis Ruiz, Glyn Mara Figueira, Marta Cristina Teixeira Duarte, Pedro Luiz Rosalen, Salete Meiry Fernandes Bersan, Severino Matias de Alencar e Vivian Fernandes Furletti de Góes, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 14/09/2011.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project **"Evaluation of antimicrobial activity of essential oils on oral pathogens"**, register number 087/2011, of Livia Câmara de Carvalho Galvão, Ana Lúcia Tasca Góis Ruiz, Glyn Mara Figueira, Marta Cristina Teixeira Duarte, Pedro Luiz Rosalen, Salete Meiry Fernandes Bersan, Severino Matias de Alencar and Vivian Fernandes Furletti de Góes, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 09/14/2011.

Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta
Secretária
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

Anexo 4: Comprovante de submissão do artigo científico à revista proposta.

Hindawi Manuscript Tracking System

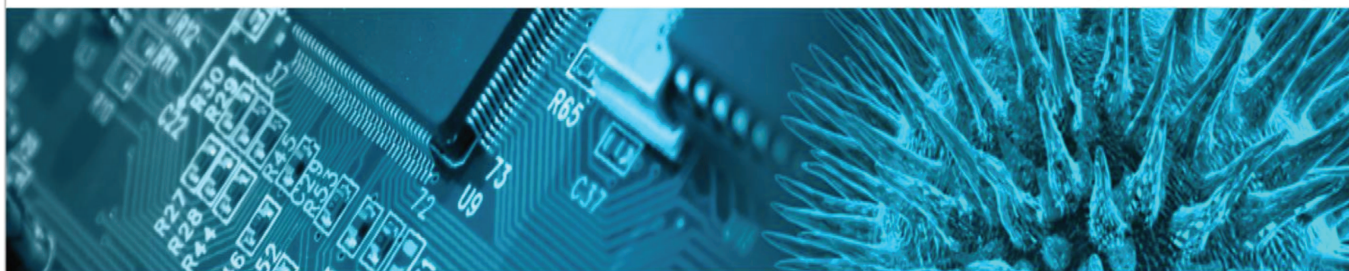
25/01/12 17:52



Hindawi Publishing Corporation

Hindawi

Lívia Câmara de Carvalho Galvão [Update My Account](#) [Logout](#)



Author Activities

751435.v1 (Research Article)

Title	Antimicrobial activity of Essential Oils on Streptococcus mutans and their antiproliferative effects
Journal	Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
Issue	Medicinal Plants in the Prevention and Treatment of Chronic Diseases (PTCD)
Manuscript Number	751435.v1 (Research Article)
Submitted On	2012-01-26
Authors	Lívia Câmara de Carvalho Galvão , Vivian Fernandes Furletti, Bersan Salete Meiry Fernandes, Marcos Guilherme Cunha, Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz, Adilson Sartoratto, Vera Lúcia Garcia Rehder, Glyn Mara Figueira, Marta Cristina Teixeira Duarte, Masaharu Ikegaki, Severino M. Alencar, P. L. Rosalen
Editor	
Editorial Recommendation	Decision not finalized
Supplementary Materials	View Supplementary Materials

Anexo 5: Certificado de correção e revisão do artigo científico na língua inglesa.

São Paulo, January 13th, 2012.

We hereby declare that the article:

"Antimicrobial activity of Essential Oils on *Streptococcus mutans* and their antiproliferative effects" has been reviewed by language professionals of Grupo Solución.

Regards,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'P. Moraes', enclosed in a rectangular box.

Paulo de Holanda Moraes

Anexo 6: Carta de aceite do artigo científico.

Anexo 6: Carta de aceite do artigo científico.

Assunto: 751435: Your manuscript has been accepted

De: William C. S. Cho (ecam@hindawi.com)

Para: liviagalvao@ymail.com;

Cc: williamcscho@gmail.com; vivifurletti@hotmail.com; saletemf@terra.com.br; mgcunhafarma@yahoo.com.br; analucia@cpqba.com.br; adilson@cpqba.unicamp.br; rehder@cpqba.unicamp.br; glyn@cpqba.unicamp.br; mduarte@cpqba.unicamp.br; masaharu.ikegaki@gmail.com; alencar@esalq.usp.br; rosalen@fop.unicamp.br;

Data: Domingo, 26 de Fevereiro de 2012 0:13

Dear Mrs. Galvão,

The review of the Research Article 751435 titled "Antimicrobial activity of Essential Oils on Streptococcus mutans and their antiproliferative effects," by Lívia Câmara de Carvalho Galvão, Vivian Fernandes Furletti, Bersan Salet Meiry Fernandes, Marcos Guilherme Cunha, Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz, Adilson Sartoratto, Vera Lúcia Garcia Rehder, Glyn Mara Figueira, Marta Cristina Teixeira Duarte, Masaharu Ikegaki, Severino M. Alencar and P. L. Rosalen submitted to Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, has been completed, and I am pleased to inform you that your manuscript has now been accepted for publication in the journal.

The special issue for which the paper is being processed is
"Medicinal Plants in the Prevention and Treatment of Chronic Diseases"

The publication process of your manuscript will be initiated upon the receipt of the electronic files. Please login to the Manuscript Tracking System at the link below using your username and password, and upload the electronic files of your final accepted version within the next 2-3 days.

<http://mts.hindawi.com/author/751435/upload.files/>

The electronic files should include the following:

- 1- Source file (Word or TeX/LaTeX).
- 2- Final PDF file of the accepted manuscript.
- 3- Editable Figure files (each figure in a separate eps/postscript/word file) if any, taking into consideration that tiff, jpg, jpeg, bmp formats are not editable.

Thank you again for submitting your manuscript to Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.

Best regards,

William C. S. Cho
williamcscho@gmail.com